***Guignardia citricarpa* Kiely: ANÁLISE GENÉTICA, CARIOTÍPICA E
INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO**

CHIRLEI GLIENKE DE BLANCO

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas.

**PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Agosto – 1999**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Blanco, Chirlei Glienke de

Guignardia citricarpa Kiely: análise genética, cariotípica e interação com o
hospedeiro / Chirlei Glienke de Blanco. - - Piracicaba, 1999.
200 p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia.

1. Análise genética 2. Ascomiceto 3. Eletroforese de campo pulsado 4.
Fungo endofítico 5. Mancha-preta-dos-citros 6. Marcador molecular 7. Mutação
8. Transformação genética I. Título

CDD 589.23

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O Autor"

Ao meu pai Elirio (*in memoriam*) pelo exemplo, amor e incentivo.

Dedico

A minha mãe Iracema, a grande responsável pela minha formação.

Aos meus irmãos Clóvis e Cintia, pelo incentivo e apoio durante toda a minha vida.

Ao meu marido Humberto, companheiro e amigo de todas as horas, pela paciência, apoio, incentivo e amor, especialmente nos momentos difíceis.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que Ele proporcionou-me durante minha vida e especialmente durante esta etapa. Agradeço pelos momentos bons e em especial pelos ruins, quando as dificuldades que surgiram em meu caminho pareceram-me intransponíveis, e Ele por meio delas, revelou-me Seu amor e Sua Graça.

Agradeço a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela sua orientação, confiança, estímulo e exemplo ao longo do curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

A FUNPAR pelo auxílio financeiro concedido.

Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- ESALQ, pela oportunidade concedida para a realização do curso.

A Profa. Aline Pizzirani-Kleiner, pela acolhida no Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ, pelo apoio e orientação nos momentos difíceis.

A todos os colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética, ESALQ, pelo carinho, incentivo e pela paciência.

Ao Dr. Walter Maccheroni Júnior, por todo auxílio, orientação e estímulo durante todo o curso.

Aos professores do Departamento de Genética da ESALQ por todo conhecimento, apoio e colaboração ao longo de todo o curso.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Genética e de outros Departamentos da ESALQ pelo carinho, amizade e incentivo, especialmente Luciana Ribeiro, Josué, Cláudio, Gilberto, Ismael, Luiz Cláudio, Carlos Aguilar, Paulo Barroso, Luiz Humberto, Solange, Sallete, Vera Lúcia, Célia Malvas, Nelson Wulff.

Às bibliotecárias Silvana Gregório, Silvana Oliveira e Elizabeth pela disponibilidade e amizade.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Genética da ESALQ, em especial, Zezo, Carmem, Adriana, Léia, Fernando, Carlinhos, Oberdan, Cezar pelo apoio e paciência em todos os momentos.

Ao Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pelo apoio na realização dos trabalhos.

Às colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da UFPR, pela amizade, paciência e incentivo em todos os momentos.

Aos professores do Departamento de Genética da UFPR, em especial Lygia, Margarete, Juárez e Cunha pelo apoio concedido nos momentos difíceis.

A todos os Laboratórios do Departamento de Genética da UFPR que contribuíram para a realização deste trabalho em especial os Laboratórios de Genética Humana e o Laboratório de Polimorfismos e Ligação.

Aos funcionários do Departamento de Genética da UFPR, em especial Izolde, Marli e Jorge pela amizade e auxílio em todos os momentos.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPR pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profª. Nilce M. Martinez Rossi do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)/USP, pela valorosa contribuição na realização deste trabalho.

À todos os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da FMRP/USP pelo auxílio, amizade e acolhida nos momentos que aí passei.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas pelo apoio concedido.

Aos amigos Vania, Guilherme e Lucas pela amizade, incentivo e toda colaboração em todos os momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ANEXOS.....	xvi
LISTA DE APÊNDICES.....	xvii
RESUMO.....	xviii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Fungos Endofíticos.....	04
2.1.1. Considerações Gerais.....	04
2.1.2. Relação com o Hospedeiro.....	06
2.1.2.1. Desempenho da Planta.....	10
2.1.2.2. Resistência a Herbivoria	11
2.1.2.3. Antagonismo a Microrganismos Patogênicos.....	12
2.1.3. Especificidade com o Hospedeiro	13
2.1.4. Endófitos e Patógenos Latentes	15
2.1.5. Isolamento	18
2.2. O Gênero <i>Guignardia</i> Viala & Ravaz (Anam.: <i>Phyllosticta</i> Pers. ex Desm.).....	19
2.2.1. A Espécie <i>Guignardia citricarpa</i> Kiely (anamorfo: <i>Phyllosticta citricarpa</i> (McAlp.) Van der AA.....	21
2.3. Genes e Fatores Envolvidos com a Interação Fungo-Planta.....	23
2.4. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	28
2.5. Clonagem e Seqüenciamento.....	32
2.5.1. Vetores de Clonagem	32
2.5.2. Seqüenciamento	33
2.6. Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE).....	34
2.7. Obtenção de Mutantes	37
2.7.1. Mutantes Auxotróficos.....	38
2.7.2. Mutantes Morfológicos	38
2.7.3. Outros Tipos de Mutantes	41

2.8. Sistemas de Transformação Genética	41
2.8.1. Métodos de Transformação Genética.....	43
2.8.2. Marcadores Seletivos Dominantes.....	47
2.8.3. O Plasmídio pCSN43	50
2.9. Microscopia Ótica e Eletrônica de Varredura	51
3. METODOLOGIA	53
3.1. Meios de Cultura	53
3.1.1. Meio Mínimo (MM) (Pontecorvo et al., 1953).....	53
3.1.2. Meio Completo (MC) de Pontecorvo, modificado por Azevedo & Costa (1973).....	53
3.1.3. Meio MCT.....	54
3.1.4. Meio MEASP (Modificado de Paterson & Bridge, 1994)	54
3.1.5. Meio YEPD	54
3.1.6. Meio LB (Sambrook et al., 1989).....	55
3.1.7. Meio Ágar-Água.....	55
3.1.8. Meio Glicose.....	55
3.1.9. Meio Sacarose	56
3.2. Soluções e Tampões	56
3.2.1. Acetato de Lítio.....	56
3.2.2. Acetato de Sódio 3M pH 5,2	56
3.2.3. Ácidos Nucleicos.....	56
3.2.4 Aminoácidos.....	57
3.2.5. Brometo de Etídio (Sambrook et al, 1989).....	57
3.2.6. Clorofane.....	57
3.2.7. Clorofil	57
3.2.8. EDTA 50 mM pH 8,0.....	57
3.2.9. EDTA 500 mM pH 8,0	58
3.2.10. Fenol saturado (Sambrook et al., 1989), modificado.....	58
3.2.11. Gel de agarose (0,8%).....	58
3.2.12. Gel de agarose (1,5%).....	58
3.2.13. Gel de agarose para PFGE (0,8%)	58
3.2.14. Gel de agarose para PFGE (1,0%)	59
3.2.15. Gel de agarose "LGT" (1,4%).....	59
3.2.16. Gel de Poliacrilamina Desnaturante 6%	59

3.2.17. Hidrato de Chloral (Bruzzese & Hasan, 1983).....	59
3.2.18. IPTG.....	59
3.2.19. Manitol 0,6 M pH 5,8.....	60
3.2.20. Manitol 1,2 M pH 5,8.....	60
3.2.21. MgSO₄ 1,2 M pH 5,8	60
3.2.22. NaCl 5M	60
3.2.23. NDS	61
3.2.24. RNase	61
3.2.25. Salina 0.85% (p/v).....	61
3.2.26. Solução A para Transformação Fúngica (SATF)	61
3.2.27. Solução B para Transformação Fúngica (SBTF).....	61
3.2.28. Solução A para Transformação Bacteriana (SATB).....	62
3.2.29. Solução B para Transformação Bacteriana (SBTB).....	62
3.2.30. Solução A para Plasmídio	62
3.2.31. Solução B para Plasmídio	62
3.2.32. Solução C para Plasmídio	63
3.2.33. Solução Clareadora (Bruzzese & Hasan, 1983).....	63
3.2.34. Solução Desnaturante	63
3.2.35. Solução Neutralizante	63
3.2.36. Sorbitol 0,6 M.....	63
3.2.37. SSC 20x	64
3.2.38. Tampão da amostra (6x).....	64
3.2.39. Tampão de corrida TAE 10X	64
3.2.40. Tampão de corrida TEB 10x pH8.0	64
3.2.41. Tampão de extração de DNA (Raeder & Broda, 1985)	65
3.2.42. Tampão Fosfato (TF) 0,2 M pH 5,8	65
3.2.43. Tampão Tris-EDTA (TE)	65
3.2.44. Tampão S	65
3.2.45. Tampão W.....	66
3.2.46. Tween-80 0.1% (v/v)	66
3.2.47. Vitaminas	66
3.2.48. X-GAL.....	66
3.3. Plasmídios	67

3.4. Amostras Foliares	67
3.5. Material Biológico.....	67
3.5.1. <i>Escherichia coli</i> DH5 α F' (Sambrook et al., 1989).....	67
3.5.2. <i>Escherichia coli</i> DH510B	67
3.5.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
3.5.4. <i>Guignardia</i> spp.....	67
3.6. Isolamento de Fungos Endofíticos.....	70
3.7. Manutenção do Estoque	70
3.8. Obtenção de Solução de Esporos.....	70
3.9. Análise da Variabilidade Genética por RAPD.....	71
3.9.1. Extração de DNA	71
3.9.1.1. Método Convencional (Raeder & Broda, 1985)	71
3.9.1.2. Método Liofilizado	71
3.9.2. Amplificação do DNA (PCR).....	72
3.9.3. Análise de Polimorfismo	72
3.10. Discriminação de Isolados Patogênicos	73
3.10.1. Obtenção da banda	73
3.10.2. Clonagem do Fragmento p373.....	73
3.10.2.1. Ligação	73
3.10.2.2. Obtenção de Células bacterianas competentes para eletroporação.....	74
3.10.2.3. Transformação bacteriana por eletroporação.....	74
3.10.2.4. Purificação do plasmídeo por Lise alcalina.....	75
3.10.3. Sequenciamento	75
3.10.4. “Southern Blotting” e Hibridação	76
3.10.4.1. “Southern Blotting”	76
3.10.4.2. Marcação da sonda	77
3.10.4.3. Hibridação.....	77
3.10.5. PCR	78
3.11. Cariótipo Eletroforético.....	78
3.11.1. Obtenção de Protoplastos (Silveira & Azevedo, 1987, com modificações)	79
3.11.2. Preparação de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
3.11.3. Preparação dos "Plugs"	79
3.11.4. Eletroforese em Campo Pulsado.....	80

3.11.4.1. Protocolo 1.....	80
3.11.4.2. Protocolo 2.....	80
3.11.4.3. Protocolo 3.....	81
3.12. Caracterização Morfo-fisiológica	81
3.12.1. Curva de Crescimento	82
3.12.2. Estudo do Tipo e Tamanho das Estruturas de Reprodução	82
3.12.3. Curva de Germinação <i>in vitro</i>	82
3.12.4. Germinação <i>in vivo</i>	83
3.12.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	84
3.13. Extração e Purificação de Exopolissacarídeos.....	84
3.14. Obtenção de Mutantes	85
3.15. Transformação Genética	86
3.15.1. Seleção do Marcador.....	86
3.15.2. Obtenção do Plasmídeo	86
3.15.2.1. Obtenção de Células Bacterianas Competentes para Transformação por CaCl_2	86
3.15.2.2. Transformação de <i>E. coli</i>	87
3.15.2.3. Purificação do plasmídeo pCSN43	87
3.15.3. Transformação de protoplastos	88
3.15.4. Transformação de Células Intactas com Auxílio de Acetato de Lítio	88
3.15.5. Estabilidade Mitótica dos Transformantes	89
3.15.6. Análise dos Transformantes via PCR.....	89
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4.1. Isolamentos de fungos endofíticos	90
4.2. Extração de DNA	90
4.3. RAPD	91
4.4. Diagnóstico Molecular de Isolados Patogênicos.....	102
4.4.1. Clonagem e Sequenciamento	102
4.4.2. "Southern Blot"	104
4.4.3. PCR	104
4.5. Cariótipo Eletroforético.....	107
4.6. Caracterização Morfológica	111
4.6.1. Curva de Crescimento	111
4.6.2. Tipo de Esporulação <i>in vitro</i> e Tamanho dos Esporos.....	125

4.6.3. Curva de Germinação <i>in vitro</i>	131
4.6.4. Germinação <i>in vivo</i>	134
4.6.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	134
4.7. Extração e Purificação de Exopolissacarídeos.....	138
4.8. Obtenção e Caracterização de Mutantes.....	140
4.8.1. Curva de Sobrevivência	140
4.8.2. Obtenção de Mutantes	142
4.9. Transformação Genética	145
4.9.1. Transformação de protoplastos.....	146
4.9.2. Transformação de Células Intactas	146
4.9.3. Estabilidade Mitótica dos Transformantes	146
4.9.4. Análise dos Transformantes via PCR.....	146
5. CONCLUSÕES	149
ANEXOS	151
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165
APÊNDICES	197

LISTA DE FIGURAS

1. Padrão eletroforético dos isolados de *Guignardia* spp, obtido com o “primer” OPX8. M: marcador de peso molecular, DNA λ clivado com HindIII. B: Controle sem DNA..... 92
2. Padrão eletroforético dos isolados de *Guignardia* spp, obtido com o “primer” OPX11. M: Marcador de peso molecular, DNA λ Clivado com HindIII 93
3. Padrão eletroforético dos isolados de *Guignardia* spp, obtido com o “primer” OPX 12. M: marcador de peso molecular, DNA “Ladder” de 100 pb. B: Controle sem DNA..... 94
4. Padrão eletroforético dos isolados de *Guignardia* spp, obtido com o “primer” OPX14. M: marcador de peso molecular, DNA “Ladder” de 100 pb. B: Controle sem DNA..... 95
5. Padrão eletroforético dos isolados de *Guignardia* spp, com o “primer” OPX17. M: marcador de peso molecular, DNA λ clivado com Hind III. B: Controle sem DNA..... 96
6. Padrão eletroforético dos isolados de *Guignardia* spp, com o “primer” OPX19. M: marcador de peso molecular, M: Marcador de peso molecular, DNA “Ladder” de 100 pb.... 97
7. Dendrograma obtido com os dados de similaridade genética dos 103 isolados de *Guignardia* spp 98
8. RAPD de 25 isolados de *Guignardia* spp com o “primer” OPX14, mostrando a banda de 373 pb. Esta banda foi encontrada exclusivamente nos isolados patogênicos de *G. citricarpa* pertencentes ao grupo 1 (Figura 7) 103
9. Sequência da banda p373 obtida por amplificação do DNA do isolado PC13, com o primer OPX14..... 104
10. DNA de 18 isolados de *Guignardia* spp, clivado com a enzima EcoRI. M: Marcador de peso molecular, DNA λ digerido com HindIII. P373: fragmento clonado e sequenciado 105
11. Reação de amplificação com os “primers” GCP1 e GCP1 de 25 isolados de *Guignardia* spp. M: marcador de peso molecular, DNA “Ladder” de 100pb. pGEM-T: plasmídeo contendo o fragmento de 373pb clonado 105
12. Reação de amplificação com os “primers” hph1 e hph2 de 25 isolados de *Guignardia* spp, como controle positivo de amplificação, realizado nas mesmas condições e ao mesmo tempo que a reação da Figura 11. M: marcador de peso molecular, DNA “Ladder” de 100 pb. pCSN43: controle positivo..... 106
13. Eletroforese em Campo Pulsado do isolado EC86 realizada com o protocolo 1. Setas indicam bandas de maior intensidade. SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MSE: *Aspergillus nidulans* 108

14. Eletroforese de Campo Pulsado dos isolados EC86, EC216, PC16 e PC4, realizada com o protocolo 2. SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MSE: *Aspergillus nidulans* 108
15. Eletroforese de Campo Pulsado realizada com o protocolo 3, para visualização de minicromossomos. SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MSE: *Aspergillus nidulans* 112
16. Média de 3 repetições das taxas de crescimento de 21 isolados de *Guignardia* spp apresentadas na Tabela 5 112
17. Reverso das placas de duas repetições do isolado ECPR6 de *G. citricarpa*, mostrando as variações na morfologia e taxa de crescimento das colônias 118
18. A e B) Reverso das placas de duas repetições do isolado EC145, mostrando a variação na morfologia das colônias. C) Morfologia do isolado EC145 119
19. Reverso das placas de duas repetições do isolado PC13 mostrando variações na morfologia das colônias 120
20. Reverso das placas de duas repetições do isolado EG3Z, mostrando variações na morfologia das colônias. Em B pode ser observado um setor deteriorado (seta) 120
21. Reverso das placas de duas repetições do isolado PC97013 mostrando as variações na morfologia das colônias 121
22. A e B mostram duas placas obtidas a partir do mesmo inóculo do isolado ECPR8, ambas em MC 122
23. A) Isolado EC131 com 4 semanas de crescimento em MC, apresentando incompatibilidade vegetativa, pouca produção de esporos e fortemente pigmentado. B) Setor do isolado EC131 com 3 semanas de crescimento, apresentando contato entre os inóculos, grande produção de esporos e coloração menos intensa. C) Uma terceira colônia do isolado EC131 com 2 semanas de crescimento 123
24. Perfil de RAPD do isolado EC131 e dos dois setores observados na Figura 23. Reação de amplificação com o “primer” OPX12. M: marcador de peso molecular, Ladder de 100 pb... 124
25. Esporos assexuais de *G. citricarpa*. A) Conídios do isolado ECPR6 (seta), produzidos em grande quantidade. Aumento: 16 x. B) Conídios do isolado ECPR10 (seta). Aumento 40 x. C) Microconídios (espermácios) do isolado PC13 (seta). Aumento 100 x 127
26. Estruturas de reprodução sexual do isolado EC145 de *G. citricarpa*. A) Pseudotécio rompido, expondo ascos jovens. B) Asco bitunicado (seta) mostrando os ascósporos em seu interior 128
27. Dendrograma mostrando os agrupamentos quanto aos tipos de esporulação *in vitro*, gerados a partir dos dados da Tabela 11, utilizando-se o coeficiente de similaridade Jaccard 129
28. Conídios do isolado PC13 germinando. Notar a germinação apical (setas) 133

29. Germinação de conídios do isolado EC145 de *G. citricarpa*, na superfície foliar de citros, com 48 horas de incubação. A) Conídios na superfície de um estômato (seta). B) Germinação com formação de apressório (seta)..... 135
30. Microscopia eletrônica de varredura de conídios do isolado EC145 em lesões em folhas de citros, após 10 dias da inoculação. A) Aumento de 500 x. Barra: 5 µm. B) Aumento de 3000 x. Barra: 2 µm..... 136
31. Microscopia eletrônica de varredura, mostrando hifas (setas) no interior de células de laranjeira tratadas com Proteinase K.. A) Aumento de 2.000 x. Barra: 5µm B) Aumento de 5.000 x. Barra: 20 µm 137
32. Curva logarítmica obtida com as porcentagens de sobrevivência dos conídios do isolado EC145 a luz ultravioleta 141
33. Caracterização do Mutante albino 145.91.2., quanto a via de biossíntese da Melanina. A) Mutante inoculado em meio MC adicionado de extrato do fungo selvagem EC145. B) Mutante inoculado juntamente com a linhagem selvagem EC145 144
34. Reação de amplificação de 7 prováveis transformantes e 19 isolados não transformados (controles negativos), com os “primers” hph1 e hph2, para amplificação de um fragmento de 462 pb do gene *hph*. M: marcador de peso molecular, DNA “Ladder” de 100pb. pCSN43: Plasmídio contendo o gene *hph*, que confere resistência a higromicina B..... 147

LISTA DE TABELAS

1. Origem, classificação e código dos isolados de <i>Guignardia</i> spp.....	68
2. Tempo necessário entre a purificação do fungo e a obtenção do DNA, utilizando-se o método convencional (micélio crescido em meio de cultura líquido) e o modificado (micélio crescido em meio de cultura sólido).....	90
3. Tamanho, em Megabases, dos 8 cromossomos encontrados no isolado endofítico EC86 de <i>G. citricarpa</i>	109
4. Número de cromossomos e tamanho do genoma de 5 fungos descritos na literatura.....	110
5. Taxas de crescimento, em centímetros, de 21 isolados de <i>Guignardia</i> spp. Média de 3 repetições.....	113
6. Análise de variância (parcelas subdivididas) dos diâmetros de colônia de 3 repetições dos 21 isolados de <i>Guignardia</i> spp, ao longo dos 24 dias de crescimento	114
7. Análise de variância dos diâmetros de colônia de 3 repetições de 21 isolados de <i>Guignardia</i> spp, após 12 dias de crescimento	115
8. Análise de variância dos diâmetros de colônia de 3 repetições dos 21 isolados de <i>Guignardia</i> spp, após 10 dias de crescimento	115
9. Comparação das médias das 3 repetições dos diâmetros de 21 isolados de <i>Guignardia</i> spp, após 12 dias de crescimento. Teste Tukey, com diferença mínima significativa igual a 2,4 centímetros	115
10. Comparação das médias das 3 repetições dos diâmetros de 21 isolados de <i>Guignardia</i> spp, após 10 dias de crescimento. Teste Tukey, com diferença mínima significativa igual a 2,3 centímetros	116
11. Tipos de estruturas de reprodução produzidas <i>in vitro</i> por 47 isolados de <i>Guignardia</i> spp....	125
12. Tamanho, em micrômetros, das estruturas de reprodução de 43 isolados de <i>Guignardia</i> spp	130
13. Porcentagem de germinação dos conídios do isolado PC13, com 2, 3 e 4 semanas de crescimento a 28°C	132
14. Porcentagem de germinação dos conídios do isolado ECPR8, com 3 e 4 semanas de crescimento a 28°C	132
15. Porcentagem de germinação dos conídios do isolado EC145 com 4 semanas de crescimento a 28°C	132

16. Produção de exopolissacarídios (EPS) pelo isolado ECPR8 com 5 dias de crescimento em 150 ml de meio contendo glicose como fonte de carbono, em diferentes pHs. O inóculo inicial foi de $1,4 \times 10^5$ esporos/ml.....	138
17. Efeitos da fonte de carbono na produção de exopolissacarídios pelos isolados ECPR8 e EC145, com 5 dias de crescimento em 1.000 ml de meio de cultura, pH 5,5	139
18. Porcentagem dos monossacarídios produzidos pelos isolados ECPR8 e EC145, com 5 dias de crescimento em diferentes condições	139
19. Caracterização dos 23 mutantes auxotróficos selecionados	142

LISTA DE ANEXOS

1. Anexo A:	151
2. Anexo B:	162

LISTA DE APÊNDICES

1. Plasmídio pGEM-T Easy Vector da PROMEGA, com 3.018pb. T7: Sítio de início da transcrição da RNA polimerase. SP6: Sítio de início de transcrição da RNA polimerase. *LacZ*: codifica para a extremidade amino terminal da β -galactosidase. *Amp^r*: Gene para resistência a ampicilina. Ori: Origem de replicação autônoma em *Escherichia coli*. Ori f1: Origem de replicação do fago m13 (*f1*) 198
2. Via de biossíntese da melanina DHN (1,8-dihidroxinaftaleno). THN: trihidroxinaftaleno 199
1. Plasmídio pCSN43, com 5.350 pb. amp: gene para resistência a ampicilina. hygB: gene para resistência a higromicina B (Hygromycin B phosphotransferase). PtpC e TtpC: sinais de transcrição do fungo *Aspergillus nidulans* 200

***Guignardia citricarpa* Kiely: ANÁLISE GENÉTICA, CARIOTÍPICA E
INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO**

Autora: CHIRLEI GLIENKE DE BLANCO

Orientador: Prof. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

Guignardia citricarpa é um fungo ascomiceto freqüentemente isolado como endófito de citros, sendo no entanto o agente causal da Mancha Preta dos Citros (MPC). Na literatura há referências sobre a existência de dois tipos de *G. citricarpa*, um deles patogênico, e outro não patogênico. Em 1994 obtivemos isolados de *G. citricarpa* provenientes de folhas de tangerineiras assintomáticas de pomares do Estado de São Paulo, nos quais a doença não era encontrada. A variabilidade morfológica e genética constatada entre eles foi explicada por duas hipóteses, a primeira de que eles pertenciam a uma população não patogênica, mas endofítica deste fungo, e a segunda de que estes isolados eram patógenos latentes. Como em 1996 a doença começou a ser relatada em diversas regiões do país, inclusive em pomares dos quais os isolados endofíticos foram obtidos, o presente trabalho foi realizado com a finalidade de, por meio de estudos genéticos, citológicos e morfológicos, tentar verificar similaridades e diferenças entre os isolados obtidos como endofíticos e isolados patogênicos. Desta forma, 103 isolados de *Guignardia* spp obtidos de diferentes hospedeiros, regiões e épocas, foram comparados por meio de marcadores de RAPD. Os isolados foram separados em pelo menos 3 grupos distintos geneticamente, sendo agrupados preferencialmente pela forma de isolamento, ou seja, de lesão de MPC ou como endofíticos de folhas aparentemente saudáveis. Das 343 bandas de RAPD obtidas, uma encontrada exclusivamente em isolados patogênicos, foi clonada e sequenciada. A partir desta sequência um par de “primers” foi sintetizado e utilizado com sucesso para discriminar os isolados patogênicos dos demais. Este par de “primers” após testes futuros poderá ser utilizado como diagnóstico molecular de isolados patogênicos de *G. citricarpa* em pomares de citros. Foi obtido também o cariótipo eletroforético de quatro isolados de *G. citricarpa*, revelando que este

fungo apresenta genoma de no mínimo 21,5 Mb distribuídos em pelo menos 8 cromossomos, não sendo encontrada variabilidade entre os isolados ensaiados. Características morfológicas também foram analisadas. A taxa de crescimento não diferenciou os isolados analisados, mas foi possível separá-los quanto ao tipo de esporulação *in vitro*, o que concordou com o agrupamento sugerido por meio de marcadores de RAPD. Estudos de germinação *in vitro* e *in vivo*, revelaram que os conídios de *G. citricarpa* possuem germinação apical com formação de apressório, sendo sugerida a adesão como pré-requisito para a germinação *in vitro*. Neste processo de adesão deve participar uma glucana β -1,6 produzida por um dos isolados estudados. A produção deste e outros exopolissacarídeos por dois outros isolados, parece ser dependente do pH e da fonte de carbono utilizada no meio de cultura. Pelos resultados obtidos, sugere-se que os isolados obtidos como endófitos, não são patógenos latentes, podendo inclusive pertencerem a outra espécie de *Guignardia*. Sendo assim, os isolados patogênicos poderão ser diferenciados dos endofíticos via PCR, utilizando-se o par de “primers” obtido neste trabalho.

SUMMARY

Guignardia citricarpa is an ascomycete fungus frequently isolated from citrus as endophyte, being however the causal agent of the Black Spot of citrus (BSC). There are in the literature references concerning the existence of two types of *G. citricarpa*, one pathogenic and one non pathogenic. In 1994 we obtained isolates of *G. citricarpa* from leaves of asintomatic tangors in orchards of São Paulo state where no disease had been found. The morphologic and genetic variabilities found among them were explained by two hypothesis, the first suggesting that they belong to a non pathogenic or endophytic population, and the second as a latent pathogen. In 1996 the disease started to be observed in several region of the country, including orchards from which the endophytic isolates were previously obtained. Thus, this present work was developed with the aim of, by means of genetic, cytological and morphologic studies, verify the similarities and differences between *G. citricarpa* obtained as endophyte and as pathogen. On this basis, 103 isolates of *G. citricarpa* obtained from different hosts, regions and seasons, were compared by RAPD markers. Isolates were separated in at least 3 distinct groups, being clustered preferentially by isolation protocol, that is, from BSC lesion (pathogen) or from apparently healthy leaves (endophyte). Of 343 RAPD bands observed, one was found exclusively in pathogenic isolates and therefore it was cloned and sequenced. Based on the revealed sequence, a pair of primers was synthesized and used with success to discriminate pathogenic isolates from the others. With additional tests, this pair of primers will be able to help the molecular diagnosis of pathogenic isolates of *G. citricarpa* in citrus orchards. We have also obtained the electrophoretic karyotype of 4 isolates of *G. citricarpa*, revealing that this fungus has a genome of at least 21,5 Mb, divided in at least 8 chromosomes. Morphologic characteristics were also analyzed in the two types of isolates. The growth rate did not discriminate the isolates, but it was possible to separate them in terms of sporulation *in vitro*, resulting in distinct groups already suggested by RAPD markers. Studies of germination *in vitro* and *in vivo* showed that *G. citricarpa* conidium germinates apically, with apressorium formation, and that adhesion seems to be a necessary step for

germination *in vitro*. During adhesion, a β 1-6 glucan produced by the isolates seems to play a role in the process. The production of this and other exopolysaccharides were analyzed by two isolates and seems to be pH and carbon source dependent. Based on the results obtained in this work, we suggest that the isolates referred as endophytes are not latent pathogens. Furthermore, they could even belong to another *Guignardia* species whereas, pathogenic isolates can be distinguished from those endophytes by PCR, using a pair of primers developed in this work.

1. INTRODUÇÃO

Guignardia citricarpa é um ascomiceto da família Dothideaceae, possui estroma plectenquimatoso e micélio fortemente pigmentado. O gênero *Guignardia* (Viala & Ravaz), compreende as formas teleomorfas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos imperfeitos, geralmente saprófitas ou semiparasitas de folhas. O gênero *Phyllosticta* com mais de 2000 espécies, compreende fungos que crescem em folhas e formam no tecido hospedeiro, pequenos picnídios com conídios hialinos e unicelulares. A separação de espécies em *Phyllosticta* é baseada principalmente no hospedeiro, e em menor grau, nas diferenças características de sintomas, picnídio, conídio e micélio, encontradas no hospedeiro. Entretanto, a importância da especificidade com o hospedeiro para a taxonomia deste fungo, tem sido superestimada, pois somente uma pequena fração de fitopatogênicos é realmente hospedeiro específica. Entretanto, experimentos com espécies de *Guignardia* e seus anamorfos, quase sempre mostram que estas são parasitas específicas para uma espécie ou espécies de um gênero de planta hospedeira. Assim, existe uma dificuldade muito grande em classificar isolados deste gênero.

Diversos autores isolaram espécies de *Phyllosticta* de material aparentemente sadio, descrevendo-as como endófitas. Em citros, *Guignardia citricarpa* pode ser encontrado na forma de infecção latente em plantas sadias, e como patógeno em lesões características da doença Mancha Preta dos Citros (MPC). Relatos na literatura indicam a existência de dois tipos de *G. citricarpa*, um deles patogênico que cresce mais lentamente em meio de cultura e produz apenas a forma imperfeita nestas condições, enquanto o outro tipo é não patogênico, cresce mais rapidamente e produz ascos maduros em meio de cultura. As formas não patogênicas podem ser divididas em

dois grupos. No primeiro, estariam as linhagens produtoras das duas formas de esporos (sexuais e assexuais), e no segundo aquelas que produzem apenas a forma sexuada, suprimindo a picnidial em meio de cultura. Em 1994, estas hipóteses ganharam mais força quando isolamos 211 colônias de *G. citricarpa* de folhas de tangerineiras assintomáticas no estado de São Paulo em pomares onde a doença não era encontrada. Nove isolados produziram a forma sexuada em meio de cultura, e todos cresceram mais rapidamente nestas condições quando comparadas com linhagens patogênicas. Duas hipóteses foram levantadas nesta época: estes isolados pertenciam a uma população não patogênica, mas endofítica deste fungo; ou estes isolados tratavam-se de patógenos latentes esperando uma mudança no estado fisiológico da planta, e/ou nas condições do ambiente. Em 1996, quando a doença começou a ser relatada em diversas regiões do país, inclusive em pomares onde os isolados endofíticos haviam sido obtidos, a segunda hipótese ganhou maior peso. Recentes trabalhos envolvendo uma espécie de *Phyllosticta ampelicida* propõem que este fungo pode comportar-se como patógeno em videira ou como infecção latente servindo apenas de inóculo, dependendo do estado de maturidade da planta infectada. Esta situação é sugerida para o tipo de relação encontrado com outros fungos endofíticos, especialmente aqueles pertencentes ao gênero *Phyllosticta*.

Várias outras espécies de fungos endofíticos também já foram relacionadas taxonomicamente a patógenos virulentos do mesmo hospedeiro, e o isolamento de fungos endofíticos pertencentes a espécies historicamente patogênicas, tem levado ao uso do termo "endofitismo" como sinônimo de latência, presumindo que alterações nas condições "microambientais" levariam ao surgimento de sintomas, sugerindo assim, transições entre estados endofíticos e patogênicos. Este pode ser o caso em alguns sistemas planta-microrganismos, mas com certeza não constitui uma regra. Assim, tais endófitos poderiam ser em maior ou menor grau, relacionados geneticamente com seus fitopatógenos correspondentes, com alta divergência genética entre eles, ou com pequenas modificações em determinados passos no estabelecimento de uma interação planta-microrganismo. Tais processos são controlados por diversos fatores, onde pequenas alterações genéticas e do ambiente, podem ser determinantes no desequilíbrio da relação planta-microrganismo. Tais alterações genéticas podem, muitas

vezes, ser identificadas por meio de técnicas moleculares, associando-se um determinado fenótipo com um marcador molecular, com variação cariotípica, ou com modificações no processo de colonização dos hospedeiros.

Muitos estudos vem sendo desenvolvidos com o objetivo de diferenciar geneticamente linhagens patogênicas e não patogênicas de uma mesma espécie de fungo e também com fungos endofíticos. Com o intuito de contribuir para a elucidação da interação endófito-hospedeiro em citros, foram comparadas por meio de marcadores de RAPD, 103 isolados de *Guignardia* spp obtidos de diferentes hospedeiros, regiões e épocas, e utilizando-se diferentes processos de isolamento. Assim, foram comparados isolados obtidos de lesão de doença (patógenos) daqueles obtidos de folhas saudáveis (endófitos). Também foram analisadas características morfológicas, buscando um marcador capaz de diferenciar os isolados.

Uma estratégia para diferenciar isolados da mesma espécie, e que tem sido amplamente utilizada no estudo de fitopatógenos, é o cariótipo eletroforético pela Eletroforese de Campo Pulsado. Muitos trabalhos tem revelado variabilidade cromossômica associada a diferentes raças de patógenos. Em *G. citricarpa*, não apenas tal variabilidade é desconhecida, como também o próprio tamanho do genoma e o número de cromossomos. Aliás, poucos conhecimentos genéticos há sobre este fungo, o que talvez se deve a falta de mutantes que possibilitem a realização de estudos genéticos, bem como a falta de um sistema eficiente de transformação genética, sendo esta, uma das principais limitações no estudo dos processos de infecção e patogenicidade da maioria dos fitopatógenos. Sendo assim, objetivou-se também neste trabalho, a obtenção do cariótipo eletroforético de *G. citricarpa*, a obtenção de mutantes e de um sistema de transformação para este fungo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos Endofíticos

2.1.1. Considerações Gerais

Tradicionalmente, a presença de fungos na parte aérea de plantas era associada a evidentes sintomas no tecido vegetal. Mais recentemente, entretanto, a ocorrência de fungos em folhas sem sintomas aparentes tem sido repetidamente relatada, sugerindo que estes microrganismos podem colonizar órgãos de plantas sem causar sintomas característicos de doença. Tais microrganismos receberam a denominação de fungos endofíticos.

O termo endófito foi utilizado inicialmente por Bary em 1866, citado por Stone (1988) e foi aplicado à flora microbiana interna dos tecidos vegetais, em casos de infecções assintomáticas ou não, e nos casos de interações antagonísticas ou simbióticas. Em 1988, Carroll utilizou o termo endófito para organismos que causam colonizações assintomáticas em folhas e ramos de plantas saudáveis, sendo encontrados frequentemente no interior das plantas.

Com o aumento de investigações na área e com as descobertas de diferentes aspectos da interação dos fungos com os seus hospedeiros, Petrini (1991) propôs para o termo endófito uma maior abrangência a fim de incluir todos os microrganismos que habitam a parte aérea das plantas, sendo capazes de colonizar, em alguma fase de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente.

O uso indiscriminado do termo endófito tem causado certa confusão. Segundo Sinclair (1991), muitos fitopatógenos latentes são isolados do interior de

tecidos vegetais, mostrando dessa forma a dificuldade em se distinguir estes de endófitos verdadeiros, segundo a definição de Petrini (1991).

Trabalhos de pesquisa sobre estes microrganismos, principalmente envolvendo o isolamento e caracterização de fungos são relativamente recentes, mas relatos sobre a ocorrência dos mesmos vem se acumulando, constatando-se sua existência nos mais diversos vegetais (Petrini et al., 1982; Clay, 1989; Bertoni & Cabral, 1988; Cerkaskas, 1988; Johnson & Whitney, 1989; Kindel et al. 1989; Fisher & Petrini, 1990; Rodrigues & Samuels, 1990; McCutcheon et al., 1993; Pereira et al., 1993; White, Jr. et al, 1993; Snetselaar & Mims, 1994; Viret & Petrini, 1994; Glienke, 1995; Barklund & Kowalski, 1996; Okane et al., 1998; Miles et al., 1998 e Rodrigues & Samuels, 1999). Além de verificar a ocorrência de endófitos, mais recentemente alguns trabalhos procuram compreender um pouco mais a interação de fungos endofíticos com seus hospedeiros. Exemplos são dados por Peters et al. (1998), que compararam a relação do endófito com o seu hospedeiro e com plantas não hospedeiras, e por Pereira et al. (1999) que estudaram a competição entre linhagens selvagens e mutantes reintroduzidas na planta.

A presença dos endófitos tem sido demonstrada principalmente pelo isolamento de fungos após a esterilização superficial dos tecidos e crescimento dos microrganismos em meio de cultura apropriado (McOnie, 1964; Leuchtmann et al., 1992; Glienke, 1995), mas outros métodos tem sido também empregados. White Jr et al. (1993) usando técnicas de coloração e microscopia de luz, detectaram a presença de micélio no espaço intercelular de folhas, sementes e talos, da gramínea *Festuca arundinacea*. Wilson et al. (1991), demonstraram a presença de hifas endofíticas em folhas e sementes de cinco espécies de *Lolium*, e em 1985 White Jr. & Cole evidenciaram hifas crescendo intercelularmente em sementes de *F. arundinacea* e *F. arizonica*. Com o emprego da microscopia eletrônica de varredura (SEM) e de transmissão (TEM), Viret & Petrini em 1994 além de detectar a presença de hifas em folhas de *Faia*, também descreveram a cinética do processo de colonização pelo fungo endofítico *Discula umbrinella*. Métodos sorológicos como ELISA, RIA, SRIA e SSEM, e técnicas de bioensaio, utilizando paraquat (Sinclair, 1991) ou testes biológicos com

afídios (Clement et al., 1990 e Wilson et al., 1991), tem sido desenvolvidos. Recentemente, alguns pesquisadores tem desenvolvido técnicas de diagnóstico molecular *in vivo* utilizando PCR (Groppe & Boller, 1997; Doss et al., 1998).

Novos métodos tem sido empregados onde é possível não apenas a localização, mas também a quantificação do endófito na planta (Herd et al., 1997; Kreuzinger et al., 1996), bem como de estudos da interação fungo-planta (Maor et al., 1998).

2.1.2. Relação com o Hospedeiro

De acordo com Bernstein & Carroll (1977), a infecção interna de folhas pode ser originada pela infecção sistêmica de sementes e pecíolos, por micélio de fungos epifíticos que entram na planta por aberturas naturais como raízes, estômatos e hidatódios, mas também podem aproveitar-se de feridas existentes no hospedeiro, como aquelas deixadas por patógenos e insetos. Outra forma de entrada no hospedeiro, é por ação ativa do endófito, ou seja, estes produzem enzimas ou estruturas que facilitam a penetração no hospedeiro (Azevedo, 1998). Os mecanismos de infecção dos fungos endofíticos já estudados, são similares àqueles dos patogênicos. No sistema *Rhizoctonia-Pseudotsuga*, a infecção ocorre externamente pela formação de apressório pelo fungo (Sherwood-Pike et al., 1986). Em *Acremonium-Festuca* as plantas são infectadas pelas suas próprias sementes.

Uma vez dentro do hospedeiro, ocorre a colonização da planta pelo endófito. Segundo White Jr. & Cole (1985) e Carroll (1988) em gramíneas os endófitos, como no caso de *Acremonium* sp em *Festuca* sp, formam infecção sistêmica sendo transmitidos de uma geração para outra, geralmente por meio das sementes dos hospedeiros não necessitando, portanto, esporular (Clay, 1988). Tais fungos são denominados por Carroll (1988) de mutualistas obrigatórios (constitutivos). Entretanto, na maioria das plantas os endófitos mutualistas facultativos (que segundo Carroll não são transmitidos via semente), propagam-se aparentemente, por meio de esporos, sendo dispersos principalmente pela chuva e correntes de ar, podendo também ocorrer através de propágulos vegetativos de alguns hospedeiros. Estes fungos possuem uma associação

muito menor com o hospedeiro quando comparados aos mutualistas constitutivos, geralmente vivendo em tecidos senescentes ou metabolicamente inativos, tais como o córtex ou epiderme, e colonizando tecidos vitais somente quando o hospedeiro é ferido ou estressado por ataques de insetos ou patógenos (Carroll, 1988 e McCutcheon et al., 1993).

Em gramíneas, são encontrados os dois tipos de relação endófito-planta. Estes endófitos, pertencentes a família *Clavicipitaceae*, são divididos em 3 grupos. A maioria das espécies (incluindo todos com reprodução assexual) podem colonizar sistemicamente a planta, a partir de sementes infectadas produzidas pela planta mãe (transmissão vertical). Espécies desta família que possuem reprodução sexuada podem ser transmitidas de uma planta infectada para uma planta vizinha não infectada (transmissão horizontal). Já algumas espécies do fungo *Epichloë* podem ser transmitidas por ambas as vias (Schardl & Phillips, 1997). No Brasil, com exceção das gramíneas, a maioria das plantas investigadas até o momento, não possuem sementes infectadas por microrganismos endofíticos.

A incidência de endófitos e a frequência de infecção variam grandemente de acordo com a espécie hospedeira e a origem geográfica do mesmo. White Jr. et al. (1993), estudando a subfamília Pooiadeae, verificaram que 30% das espécies abrigavam endófitos em níveis variados de infecção, sendo o fungo *Acremonium* sp. isolado em maior frequência. Este fungo entretanto, quando infecta outras subfamílias de gramíneas, constitui-se um potente fitopatogênico. Este fato, segundo os autores, sugere uma relação coevolutiva entre a subfamília Pooiadeae, e o fungo *Acremonium* sp. Os autores também sugerem uma classificação desse endófito em três categorias, dependendo do grau com que forma estroma (região produtora de conídios e ascósporos) na população desta forrageira. Desta forma, quando estromas são formados em todos os indivíduos infectados, de modo que a reprodução sexual dessas plantas é completamente suprimida, estes endófitos são considerados patógenos (tipo I) e crescem rapidamente em todos os meios de cultura. Segundo Clay (1989), estes fungos são agentes potenciais de biocontrole em plantas perenes, podendo inclusive induzi-las a expandirem-se vegetativamente.

Quando estromas são formados em uma fração da população infectada, causando pequena esterilização na população, de forma que o fungo possa ser transmitido pela semente do hospedeiro, estes endófitos pertencem ao tipo II. Endófitos isolados deste tipo de infecção apresentam uma variabilidade considerável na taxa de crescimento. Já os endófitos do tipo III, não formam estromas nas plantas infectadas, sendo transmitidos exclusivamente pela penetração no embrião na semente, e crescem vagorosamente em meio de cultura. Segundo White Jr. et al. (1993), não há qualquer evidência de que este tipo de infecção seja detrimental para a planta, e o endófito neste caso, não pode ser considerado um patógeno. A formação do estroma parece estar relacionada com a capacidade deste fungo em utilizar o açúcar disponível na planta, no momento da formação do estroma.

Trabalhos utilizando microscopia de luz e mais recentemente, eletrônica (SEM e TEM), tem não apenas detectado a presença de fungos no interior dos hospedeiros, mas também mostrado a sua localização, e esclarecido o processo de penetração dos endófitos nas plantas (Viret & Petrini, 1994). Clay (1987), verificou a presença de hifas dos fungos *Acremonium loliae* e *A. coenophialum* (atualmente designado de *Neothypholium coenophialum*) no espaço intercelular da região meristemática, no mesófilo das folhas, no cerne da inflorescência na semente, mas não encontrou hifas no interior das células. Johnson & Whitney (1989) também verificaram a presença de hifas no espaço intercelular e aderidas na parede externa de células do parênquima, porém nenhuma hifa no espaço intracelular foi observada. White Jr. et al. (1993) usando técnicas de coloração e microscopia ótica, detectaram a presença de micélio no espaço intercelular de folhas, sementes e talos, de *Festuca arundinaceae* (gramínea). Wilson et al. (1991), demonstraram a presença de hifas endofíticas em folhas e sementes de cinco espécies de *Lolium*, e White Jr & Cole (1985) evidenciaram hifas crescendo intercelularmente em sementes de *F. arundinaceae* e *F. arizonica*.

Stone em 1988, verificou a presença de hifas de *Phyllosticta abietina*, formando limitada infecção no mesófilo de Douglas fir e *Abies* spp. que são originadas de penetração entre células epidérmicas. Segundo Fisher et al. (1994) entretanto, *Phyllosticta concentrica* coloniza espinhos de *Taxus brevifolia* de forma subcuticular

sem colonizar tecidos internos. Em contraste com a extensa colonização de gramíneas por hifas de endófitos clavicipitáceos, a colonização de endófitos em outros hospedeiros é muito mais limitada. Esses fungos geralmente causam infecção restrita, e não sistêmica em tecidos sadios e são transmitidos a outros hospedeiros por meio de seus esporos. Parece haver predominância de uma ou poucas espécies de fungos em um determinado hospedeiro, mostrando uma reduzida variabilidade na flora micótica, sendo que a composição das espécies pode variar em relação à espécie e distribuição geográfica dos hospedeiros, idade das plantas, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação anual (Carroll & Carroll, 1978; Wilson et al., 1991; Agostini et al., 1992; Azevedo, 1998).

Segundo White Jr. & Cole (1985), a presença de endófitos em gramíneas pode variar dentro de espécies de um mesmo gênero de hospedeiro. Nestes hospedeiros também é encontrada uma grande variabilidade genética entre isolados endofíticos da mesma espécie. Tal variabilidade também foi encontrada em isolados do fungo *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas (Glienke, 1995). A mesma situação também foi observada com isolados de banana (Longo, 1995) e milho (Ribeiro, 1995 e Souza, 1996). Em *Rhizoctonia parkeri*, utilizando RAPD, McCutcheon et al. (1993), encontraram maior variabilidade genética em fungos coletados em folhas maduras, em comparação com uma menor variabilidade achada em fungos provenientes de folhas jovens.

Viret & Petrini (1994), estudando a colonização de folhas de faia (*Fagus sylvatica*) pelo fungo *D. umbrinella*, propuseram a existência de duas fases na infecção desse endófito. Segundo estes autores, inicialmente ocorre a formação de apressório e digestão enzimática da cutícula e células da epiderme no hospedeiro durante o processo de penetração da hifa. Após a infecção, o fungo permanece latente a nível subcuticular ou subepidérmico, por um período que pode variar entre 48 horas a vários dias. O endófito coloniza o espaço intercelular do mesófilo, no qual pode formar uma associação neutra e transitória com o hospedeiro. Na segunda fase de infecção, o fungo *D. umbrinella* cresce intracelularmente, podendo formar haustórios, o que geralmente resulta na morte prematura das células infectadas, como já verificado para *R. parkeri* por

Stone (1988). Isto permite, segundo Viret & Petrini (1994), diferenciar os fungos endofíticos não clavicipitáceos dos organismos biotróficos verdadeiros (que crescem em outros organismos em íntima associação com seu citoplasma).

Tanto em *D. umbrinella* como em *R. parkeri*, falta a estrutura característica (colarinho) da maioria dos fungos que formam haustório, sendo interpretado por Stone (1988), como atestado da natureza transitória da fase biotrófica na simbiose endofítica. Além disso, eles são diferentes dos endófitos sistêmicos de gramíneas, por apresentarem uma distribuição limitada no tecido hospedeiro durante a fase endofítica, espalhando-se somente na senescência do hospedeiro ou sob condições de estresse deste. A notável semelhança na penetração do hospedeiro pelos endófitos não clavicipitáceos de diferentes hospedeiros, representa, segundo Viret & Petrini (1994), que estes fungos formam um compacto grupo com semelhantes requisitos ecológicos e fisiológicos o que distingue-os claramente dos seus sócias clavicipitáceos.

Embora as interações entre vegetais e endófitos, na maioria dos casos ainda não sejam bem esclarecidas, já tem sido verificado que os endófitos apresentam uma relação mutualística, antagonística ou neutra com o hospedeiro. Em alguns casos foram encontradas interações que levam a um melhor desempenho das plantas com aumento de área foliar e maior número de ramificações, maior tolerância ao ataque de insetos, resistência a doenças e parasitas, resistência a nemátodos e antiherbivoria pela produção de toxinas.

2.1.2.1. Desempenho da Planta

A porcentagem de sementes granadas produzidas pelas plantas de *Festuca arundinacea* infectadas com fungos endofíticos, segundo Clay (1987), pode ser duas vezes maior quando comparadas àquelas não infectadas. Além disso, o autor também verificou uma taxa maior de germinação das sementes nas plantas infectadas, bem como maior produção de biomassa. Clay (1987) sugere que a concentração de hifas em regiões meristemáticas dos seus hospedeiros, poderia facilitar a regulação hormonal da divisão celular e diferenciação dos tecidos.

Segundo Clay (1989), estas alterações e também outras a nível morfológico, verificadas em gramíneas infectadas por endófitos, geralmente contribuem para o seu vigor e independentemente de resistência a insetos, pois as plantas infectadas mostraram um aumento na taxa de crescimento em relação às não infectadas, mesmo em ambiente controlado sem a presença de insetos. Tal situação é portanto, resultado da ação de outros fatores. Portanto, o maior tamanho de plantas infectadas por endófitos na natureza e seu maior crescimento e sobrevivência em experimentos de campo, são provavelmente devido a combinação de resistência a insetos e desses outros fatores. Marks & Clay (1996) testaram 13 genótipos de *Festuca arundinacea*, infectados e não infectados pelo fungo endofítico *Acremonium coenophialum* quanto a respostas fisiológicas, e verificaram que em alguns genótipos em altas temperaturas (acima de 35°C), a taxa fotossintética foi superior (20-25%) nas plantas infectadas pelo fungo.

Springer (1997) verificou que a alelopatia sofrida algumas vezes por plantas de *Trifolium* quando na presença de *Festuca arundinacea* pode ser conferida pelo fungo endofítico *A. coenophialum* presente nestas plantas. Vários estudos estão sendo realizados onde compostos são isolados de plantas, identificados e quantificados, correlacionando sua concentração com a presença de endófitos, como *Acremonium lolii* (Ball et al., 1995) e *A. coenophialum* (Sepulveda et al., 1996). Segundo White Jr. et al. (1993), estes compostos podem causar alterações na fisiologia da planta hospedeira, e talvez ter um papel na relação de nutrientes entre hifas do fungo e células hospedeiras. Tal mecanismo é sugerido pela semelhança estrutural de muitos destes alcalóides com auxinas produzidas pelas plantas, que são conhecidas por alterar as membranas e paredes das células. Por outro lado, foi verificado que o fungo *Fusarium moniliforme* produz giberelina, podendo ocasionar modificações morfológicas teratogênicas nas plantas hospedeiras (Azevedo, 1998). Já foi verificada a produção de vários reguladores de crescimento vegetal, por fungos patogênicos e também não patogênicos. Além de auxinas e giberelinas, já foi descrito a produção de citocininas, ácido abscísico e etileno.

2.1.2.2. Resistência a Herbivoria

Estudando a gramínea *Diuraphis noxia* (Mordvilko), Clemente et al. (1990), verificaram que a presença de fungos endofíticos está associada ao aumento da resistência a insetos. Há vários exemplos na literatura sugerindo tal fenômeno. Clay (1989), verificou que muitas gramíneas infectadas por pelo menos dez endófitos clavicipitáceos diferentes, são mais tóxicas resultando na redução da sobrevivência, crescimento e desenvolvimento de insetos, quando comparadas àquelas não infectadas. Johnson et al. (1985) também verificaram que duas espécies de afídios foram incapazes de sobreviver quando confinadas a *Festuca* sp infectadas por endófitos. Eles verificaram também, que muitos insetos discriminam entre plantas de centeio e *Festuca* sp infectadas e não infectadas por endófitos. Tal fenômeno também foi verificado em diversos sistemas por Carroll & Carroll (1978), Koga (1995) e Faeth & Hammon (1996), sugerindo que os fungos endofíticos poderiam conferir resistência à herbivoria aos seus hospedeiros, diminuindo a palatabilidade destes de forma que os predadores passassem a evitá-los. Outro exemplo interessante é dado por Bing & Lewis (1993) que encontraram o fungo *Beauveria bassiana* como endófito de milho protegendo o hospedeiro contra o ataque de insetos.

Segundo Clay (1989), endófitos clavicipitáceos de gramíneas produzem um número de compostos biologicamente ativos tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo estes provavelmente os responsáveis pelos efeitos nocivos em animais herbívoros. Estes alcalóides produzidos pelos endófitos são geralmente referidos como capazes de conferir maior defesa ao seu hospedeiro. Breen (1994), Schardl & Phillips (1997) e Chai & Stiscklen (1998) fazem uma revisão sobre a utilização de fungos endofíticos para o melhoramento de gramíneas visando resistência a insetos. Segundo Schardl & Phillips (1997), os alcalóides produzidos pelos fungos endofíticos podem ser classificados em 4 classes: os alcalóides ergot, os indolediterpenos, as pirrolopirazimas e as aminopirrolizidinas saturadas. Segundo os autores três das quatro classes são produzidas pelos fungos em meio de cultura e todas as quatro tem ação contra insetos e mamíferos.

2.1.2.3. Antagonismo a Microrganismos Patogênicos

Além de aumentar o desempenho da planta e protegê-las contra o ataque de herbívoros e insetos, outro possível benefício para plantas hospedeiras é o antagonismo contra parasitas patogênicos e saprófitas, decrescendo a senescência da planta (Carroll & Carroll, 1978 e Carroll, 1988). O antagonismo proporcionado pelo endófito de gramíneas *Acremonium coenophialum* contra diversos patógenos, foi reportado por White Jr. & Cole (1985). O filtrado da cultura de *A. coenophialum* inibe crescimento *in vitro* dos fungos *Nigrospora sphaerica*, *Periconia sorghina*, e *Rizoctonia cerealis*, conhecidos patógenos de gramíneas. Christensen (1996) verificou que alguns isolados de *Acremonium* spp. e *Epichloe festucae* de *Festuca* spp e *Lolium perenne* produzem substâncias com ação antifúngica, inibindo o crescimento dos fitopatógenos *Drechesrela erythrospila* (*Pyrenophora erythrospila*) e *Rhizoctonia zeae*, *in vivo* e *in vitro*.

Clark et al. (1989) encontraram três linhagens endófitas (uma de *Phyllosticta* sp e duas de *Hormonema dematioides*) isoladas de coníferas, que produzem metabólitos com efeitos citotóxicos para células HeLa e para células da larva parasita destes pinheiros. Por outro lado, estes metabólitos podem aumentar a susceptibilidade dos parasitas a fungos ou bactérias patogênicas, conferindo maior resistência aos hospedeiros de tais endófitos. Os metabólitos produzidos por *Phyllosticta* sp, foram identificados por Calhoun et al. (1992), como ácido sesquiterpeno lactona heptelídico, ácido clorohidrino heptelídico e ácido hidroheptelídico.

Kimmons et al. (1990) verificaram que a presença do fungo endofítico *Neothyphodium coenophialum* (anteriormente designado de *Acremonium coenophialum*) confere a *Festuca* proteção contra nematóides. Ju et al. (1998), verificaram a produção de flavonóides por este mesmo fungo enquanto endófito da gramínea *Poa ampla*. Tais flavonóides mostraram-se ativos também contra o desenvolvimento de larvas de mosquitos.

2.1.3. Especificidade com o Hospedeiro

Alguns pesquisadores tem se dedicado a verificar a existência de especificidade entre os tecidos dos hospedeiros e seus endófitos. Fisher & Petrini (1990),

por exemplo, isolaram *Melanconium apiocarpum* Link e *Cryptosporiopsis* sp, exclusivamente da casca de *Alnus glutinosa*, e não do xilema, sugerindo assim uma especificidade em nível de tecido. Nestes casos, a análise de agrupamentos mostrou que os diferentes órgãos e tecidos das plantas examinadas podiam ser separados com base em seus fungos endofíticos, apoiando a hipótese de Carroll (1988), de que alguns endófitos tem sofrido coevolução com seus hospedeiros. Esta especificidade só foi demonstrada nos tecidos da parte aérea da planta, pois os fungos isolados das raízes, eram habitantes comuns do solo e da rizosfera.

São conhecidos poucos casos de estrita especificidade entre hospedeiro e endófito. Um exemplo é o fungo *R. parkeri* que foi encontrado por Carroll (1988) somente no "pinheiro de Douglas" (Pinacea) e em nenhuma outra conífera simpátrica na Costa Noroeste dos EUA. Outras observações também foram feitas, indicando que alguns fungos são muito seletivos, sendo limitados a um ou poucos hospedeiros intimamente relacionados taxonomicamente (Petrini & Fisher, 1990 e Fisher & Petrini, 1990). Leuchtmann et al. (1992), estudando o polimorfismo enzimático de seis espécies do fungo *Phyllosticta*, verificaram que a distribuição de fenótipos enzimáticos mostrou um padrão relacionado ao hospedeiro.

Inicialmente, Petrini et al. (1982) verificaram um padrão de dominância de espécies onde o endófito encontrado em maior frequência em uma determinada espécie vegetal, era isolado menos frequentemente de outros hospedeiros. Por outro lado, os endófitos encontrados com frequência menor em uma planta, pareciam ser menos específicos, isto é, eram isolados em um amplo espectro de hospedeiros, mas pouco frequentemente.

Porém atualmente, um grande espectro de hospedeiros é a situação comumente observada pelos pesquisadores. Pereira et al. (1993), por exemplo, citam os fungos *Colletotrichum* sp e *Xylaria* sp como endófitos comuns em hospedeiros tropicais, não sendo encontrados nestes, um padrão de dominância. Petrini et al. (1995) e Lodge et al. (1996) encontraram várias espécies de *Xylaria* como endófitos comuns de uma grande variedade de hospedeiros. Os fungos do gênero *Geniculosporium*, *Phyllosticta*, *Phomopsis* e *Cryptocline*, segundo Petrini (1986) e os gêneros *Cryptosporiopsis* e

Leptostroma segundo Carroll (1988), ocorrem em hospedeiros pertencentes a diferentes famílias de plantas. Petrini et al. (1982), também citam as espécies *Phyllosticta pirolae*, *Leptothyrium berberidis*, *Septogloeum* sp e *Phomopsis* sp, como os isolados mais comuns em cinco espécies do gênero *Pinus*. Os fungos *Guignardia citricarpa* e *Colletotrichum* sp. também foram encontrados como endófitos comuns em citros (Glienke, 1995). Portanto, algumas observações recentemente tem mostrado que alguns endófitos como *Phyllosticta* spp (*Guignardia* spp), possuem ocorrência mais geral e podem ser encontrados em alta frequência nos mais diversos hospedeiros (Azevedo, 1998).

No gênero *Colletotrichum* são encontradas muitas espécies que coletivamente infectam virtualmente todas as principais espécies de plantas agrícolas. As espécies deste gênero variam tremendamente no espectro de hospedeiros, sendo que algumas causam doenças em uma única espécie vegetal enquanto outras afetam mais do que 50 hospedeiros diferentes.

2.1.4. Endófitos e Patógenos Latentes

A infecção latente de plantas por patógenos tem sido reconhecida há muitos anos e é freqüentemente considerada como um dos mais altos níveis de parasitismo, uma vez que o hospedeiro e o parasita coexistem com mínimo dano ao hospedeiro. Agrios (1988) definiu infecção latente como o estágio em que um hospedeiro é infectado com um patógeno mas não apresenta sintomas de doença, e persiste até que sinais ou sintomas estão prontos a aparecer por condições nutricionais ou pelo estágio de maturidade do hospedeiro ou patógeno (Cerkauskas, 1988; Agostini et al., 1992; Viret & Petrini, 1994). Portanto, todos os patógenos, exceto tipos necrofilicos, tem um período latente em que se ramificam no tecido hospedeiro e começam a causar mudanças na fisiologia deste.

Segundo Sinclair (1991), a infecção latente pode ser reconhecida como um tipo de tolerância ou resistência a certos patógenos, onde o parasita encontra o ambiente interno impróprio para crescimento e multiplicação, e resulta de um processo de coevolução entre plantas e patógenos. Tal coevolução permitiria a maior acumulação

de resistência e aptidão gênica no hospedeiro e vários parasitas, onde a alta susceptibilidade individual de plantas, e a alta virulência dos patógenos seriam eliminadas no início do processo evolutivo. Este tipo de infecção é importante na epidemiologia e controle de doenças de plantas e também na obtenção de resistência ou tolerância a um patógeno.

Segundo Rodriguez & Redman (1997), fungos endofíticos não elicitam sintomas significativos de doença, mas mantêm os mecanismos bioquímicos e genéticos requeridos para a infecção e a colonização de plantas hospedeiras. Segundo os autores, há 4 classes de fungos endofíticos de acordo com o comportamento no tecido vegetal: 1) Fungos que crescem ativamente dentro do tecido hospedeiro, resultando em extensa colonização (White Jr. & Morrow, 1990); 2) Fungos que crescem ativamente dentro do hospedeiro, mas apenas colonizam áreas limitadas do tecido vegetal; 3) Fungos que crescem muito mal dentro do hospedeiro, em função de respostas deste, ficando quiescentes até a senescência do hospedeiro; 4) Fungos que crescem muito mal dentro do hospedeiro, mas permanecem metabolicamente ativos.

Rotineiramente a identificação de fungos endofíticos envolve esterilização superficial de tecidos hospedeiros. Porém, isto não define a extensão de colonização do tecido ou a atividade metabólica do endofítico. Independente do tipo de classe, qualquer endófito pode manter suas bases bioquímicas e genéticas necessárias para infectar tecidos vegetais. A principal diferença entre as classes, é que o fungo que coloniza extensivamente o hospedeiro, deve evitar ou é imune ao sistema de defesa da planta. Assim, tais fungos são funcionalmente equivalentes aos patógenos com interação compatível com o hospedeiro (que desenvolvem a doença) mas não elicitam sintomas de doença. Por outro lado, os tipos 3 e 4 são idênticos funcionalmente aos patógenos que mantêm uma interação incompatível com o hospedeiro (Rodriguez & Redman, 1997).

Diversas espécies de *Colletotrichum* são considerados patógenos latentes porque induzem lesões em tecidos vegetais senescentes. É possível que os patógenos latentes estejam atualmente em estágios evolutivos transitórios entre patógenos virulentos e aqueles endófitos ou saprófitos. Por outro lado, patógenos latentes podem ser saprófitas sofisticados que tem desenvolvido um mecanismo para evitar competição

no solo, colonizando parcialmente tecidos vegetais antes da senescência do hospedeiro. Na verdade, a colonização restrita do hospedeiro antes da senescência deste, pode ter pouco ou nenhum impacto no desempenho do hospedeiro. Este tipo de interação pode favorecer o patógeno latente significativamente na competição com fungos saprofíticos, que são incapazes de colonizar tecidos vegetais não senescentes.

Em gramíneas, algumas vezes a patogenicidade está relacionada com a fase sexual de fungos pertencentes a família Clavicipitaceae. Neste caso, Sinclair propôs em 1991, o termo endófito clavicipitáceo anamorfo, para o fungo mutualista, e endófito clavicipitáceo teleomorfo para o patogênico. Na gramínea *Festuca arundinacea* var. *genuina* Schieb., Bacon et al. (1977) encontraram um fungo endofítico muito semelhante ao patógeno *Epichloë typhina*. Entretanto, baseados em dados de sequenciamento, Gleen et al. (1996) diferenciaram tais classes, e criaram um novo gênero, *Neothyphodium*, sendo este endófito atualmente designado de *N. coenophialum* (Schardl & Phillips, 1997). Usando regiões ITS-1, White Jr. & Reddy (1998) conseguiram a separação de espécies endofíticas e epibióticas de *Epichloë* e criaram o gênero *Parepichloë* para os epibióticos.

Segundo Kuo & Hoch (1996b) quando o fungo *Phyllosticta ampellicida* infecta tecidos de videira ainda em crescimento (imaturos), os sintomas de doença são expressados como lesões necróticas. Quando infecta tecidos que já cessaram o crescimento (maduros), as hifas fúngicas são limitadas ao endofitismo assintomático, ou seja, não são capazes de desencadear a doença e servem apenas como fonte de inóculo. Kuo & Hoch (1996b) sugerem que o mesmo fenômeno possa acontecer com outras espécies do gênero encontradas como endofíticas de culturas que são normalmente patogênicas, e mesmo com outros fungos como *Phomopsis*, *Diplodia natalensis* e *Botrytis cinerea*.

Alguns fungos são capazes de expressar todos os estilos de vida, como por exemplo *Colletotrichum magna*. Tal espécie é patogênica em uma variedade de cucurbitáceas, um saprofítico em material vegetal e como endofítico de tomate (Freeman & Rodriguez, 1993). Segundo Rodriguez & Redman (1997), especula-se que dependendo do estágio da dinâmica do ecossistema e da estrutura da comunidade,

fungos como *C. magna*, podem comumente transitar entre pontes fisiológicas de patogenicidade, endofitismo, saprofitismo e dormência. Se situações como esta forem comumente relatadas, isto pode sugerir que a classificação destes organismos em categorias restritas é, na verdade, irreal e reflete uma falta de conhecimento científico.

Sendo assim, quando microrganismos endofíticos são isolados, pode-se estar isolando também patógenos latentes destes hospedeiros. Segundo Azevedo (1998), é muito difícil estabelecer um limite entre microrganismos endofíticos e patogênicos latentes, sendo que muitos endófitos são estreitamente relacionados com patógenos. Tal situação foi relatada por Glienke (1995) quando o fungo *Guignardia citricarpa*, conhecido como patógeno de citros, foi isolado de forma endofítica destes hospedeiros.

2.1.5. Isolamento

A melhor maneira de se estudar os fungos endofíticos é por meio de seu isolamento e cultivo em laboratório. Para tanto, é preciso eliminar todos os microrganismos que vivem na superfície externa dos hospedeiros (os epifíticos), por meio da sua desinfecção superficial. O processo de esterilização e os tempos necessários para tal, variam conforme o hospedeiro, e dependem basicamente da espessura da cutícula e da epiderme dos tecidos (Pereira et al., 1993). Quando os tempos de esterilização são insuficientes, também crescerão os organismos epifíticos. Por outro lado, se a solução esterilizante penetrar no interior dos tecidos vegetais, poderá eliminar os endófitos, tanto qualitativamente como quantitativamente.

Segundo Carroll (1986) e Petrini (1986) há vários trabalhos ensaiando métodos de esterilização, e em alguns, o processo utilizado não é eficaz, permitindo que determinados saprófitas epifíticos, como *Cladosporium* spp., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud, e *Epicoccum purpurascens* Ehrh. ex Schlect, sejam isolados após a esterilização da superfície das plantas, pois segundo Petrini (1986), é possível que alguns esporos ou fragmentos de hifas possam sobreviver aos processos de esterilização. Entretanto, Schulz et al. (1993) demonstraram que os endófitos isolados de folhas esterilizadas externamente com métodos baseados em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) ou em formaldeído, eram morfologicamente

diferentes dos epifíticos, mesmo quando pertencentes a mesma espécie. Isolados idênticos aos epifíticos, só foram encontrados quando apenas etanol 50% foi utilizado para esterilização externa das folhas.

Porém Cabral (1985) também verificou que fungos que habitam a superfície externa das folhas podem colonizar o interior de órgãos de plantas, principalmente quando há um decréscimo de espécies endofíticas após o início do processo de senescência dos tecidos. Tais fungos, denominados por Petrini (1986) de endófitos facultativos, estão relacionados com a decomposição de matéria orgânica e são mais freqüentemente isolados de tecidos velhos. Portanto, segundo Azevedo (1998), muitas vezes são necessárias várias coletas e em diferentes épocas para distinguir os reais endofíticos dos microrganismos epifíticos e/ou contaminantes.

2.2. O Gênero *Guignardia* Viala & Ravaz (Anamorfo : *Phyllosticta* Pers. ex Desm.)

O gênero *Guignardia* que segundo Sivanessam (1984) foi descrito em 1892 por Viala e Ravaz, compreende as formas teleomorfas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos imperfeitos, geralmente saprófitas ou semiparasitas de folhas. O gênero *Phyllosticta* com mais de 2000 espécies, foi descrito por Van Der AA (1973) para fungos crescendo em folhas e formando no tecido hospedeiro, pequenos picnídios com conídios hialinos e unicelulares. *Phyllosticta* é relacionado com alguns outros gêneros de Sphaeropsidales, que tem também *Guignardia* e *Botryosphaeria* como teleomorfos. O gênero *Phoma* não é diretamente aparentado, mas segundo Sivanessam (1984) é freqüentemente confundido com *Phyllosticta*. Entretanto, os seus conídios que são unicelulares ou ocasionalmente septados, geralmente são menores do que aqueles de *Phyllosticta* e não possuem a camada gelatinosa e o apêndice apical.

A separação de espécies em *Phyllosticta* é baseada principalmente no hospedeiro, e em menor grau, nas diferenças características de sintomas, picnídio, conídio e micélio, encontradas no hospedeiro (Van Der AA, 1973). Quando duas ou mais espécies de *Phyllosticta* são encontradas em um mesmo hospedeiro, estas podem ser distinguidas morfológicamente. Entretanto, a importância da especificidade com o

hospedeiro para a taxonomia de fungos em geral e para Sphaeropsidales em particular, tem sido superestimada, pois segundo Van Der AA (1973), somente uma pequena fração de fitopatogênicos é realmente hospedeiro específica. Entretanto, segundo Bisset & Palm (1989) e Leuchtmann et al. (1992), experimentos com espécies de *Guignardia* e seus anamorfos, quase sempre mostram que estas são parasitas específicas para uma espécie ou espécies de um gênero de planta hospedeira.

Por outro lado, Kiely (1948) e Schüepp (1961) relataram a presença de espécies de *Phyllosticta* semelhantes morfologicamente em plantas não aparentadas, crescendo perto de pomares de *Citrus*, onde eles estudaram a doença Mancha Preta dos Citros causada por *Guignardia citricarpa*. Recentemente, análises filogenéticas de seqüências do DNA ribossomal codificante para o rRNA 18S, tem auxiliado na sistemática de muitos fungos, inclusive *Guignardia* (Silva-Hanlin & Hanlin, 1999).

Ainda segundo Van Der AA (1973), *Phyllosticta concentrica* Sacc. [Teleomorfo : *Discochora philoprina* (Berk. e Curt.) Bisset] é uma espécie encontrada em um amplo espectro de hospedeiros, ocorrendo em diversas famílias de Angiospermas, incluindo Aquifoliaceae, Araliaceae, Ericaceae, e Magnoliaceae e Taxaceae em coníferas.

Diversos autores, como Carroll & Carroll (1978), Petrini (1986), Leuchtmann et al. (1992), Glienke (1995) e Rodrigues & Samuels (1999) isolaram espécies de *Phyllosticta* de material aparentemente sadio, descrevendo-as como endófitas. No entanto o maior número de relatos cita este gênero como fitopatogênico, tendo já sido descrito em abacate e tomate (Baker, 1938), *Andropogon* (Krupinsky & Tober, 1990), arroz (Sugha et al., 1986), cana de açúcar (Pons, 1990), citros (McOnie, 1964; Johnston & Fullerton, 1988 e Herbert & Grech, 1985), eucalipto (Crous et al., 1993), manga e mamão (McMillan Jr., 1986), *Pennisetum* (Wilson & Burton, 1990), tabaco (Patel et al., 1988), uva (Jailloux, 1991, Janex-Favre et al., 1993 e Kuo & Hoch, 1996a) e morango (Stiles & Oudemans, 1999). Em *Citrus* spp várias espécies de *Phyllosticta* já foram descritas, como por exemplo, *P. aurantiicola*, *P. citricarpa*, *P. erratica*, *P. hesperidearum*, *P. longispora* (Farr et al., 1989) e *P. lenticularis* (Johnston & Fullerton, 1988).

Apesar de ser um fungo amplamente encontrado na natureza, há vários relatos na literatura de que esporos de espécies de *Phyllosticta* possuem uma taxa de germinação inferiores a 5% em meio de cultura mesmo após 12 horas de incubação. Inicialmente acreditava-se que vários fatores exógenos interferiam na germinação, e segundo Kuo & Hoch (1995), seria necessário a lavagem dos conídios para eliminar possíveis substâncias que inibiriam a germinação conidial, e também a eliminação dos espermácios. Entretanto, Kuo & Hoch (1996a), estudando o fungo patógeno de videiras, *Phyllosticta ampellicida*, mostraram que a germinação dos conídios é dependente da sua adesão ao substrato. Os esporos só são capazes de germinar se houver uma adesão firme em determinados substratos, como a própria folha do hospedeiro, polistireno, Teflon, policarbonato entre outros. Neste fungo, o apêndice mucilaginoso do conídio pode servir para aderência no hospedeiro. Tal adesão pré germinação já havia sido documentada para o fungo *Magnaporthe grisea* (Hamer et al., 1988), porém neste patógeno, a adesão não constitui-se pré requisito para a germinação. Kuo e Hoch (1996b) também mostraram que a adesão não é dependente de processos metabólicos associados ao conídio.

Shaw et al. (1998), relatam a presença de corpos esféricos contendo lipídios no citoplasma de conídios de *P. ampellicida*. Os autores também observaram a produção de melanina no apressório deste fungo, sendo que a produção máxima deste pigmento ocorreu após 48 horas de incubação. Quando o fungicida Triciclazole (50 µg/ml) foi acrescentado ao meio de cultura, houve inibição da produção de melanina no apressório. Shaw et al. (1998) concluíram que a melanina é derivada de 1,8-dihidroxinaphalene (DHN), uma vez que segundo Bell & Wheeler (1986) o Triciclazole atua inibindo a ação de enzimas nesta via de biossíntese.

2.2.1. A Espécie *Guignardia citricarpa* Kiely (anamorfo: *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van der AA

Segundo Sivanesam (1984), *Guignardia citricarpa* é um ascomiceto, Loculoascomiceto, da ordem Dothideales e família Dothideaceae. Este fungo Ascomiceto é homotático e possui estroma plectenquimatoso, pseudotécio globoso a subgloboso,

medindo 125 a 360 μm de diâmetro, contendo um poro de 14 a 16 μm , paredes espessas com 20 a 22 μm . Asco na forma de clava, arredondado na extremidade superior, bitunicado, contendo 8 ascósporos unicelulares, hialinos, ligeiramente cinzentos, rombóides, contendo grânulos e um grande vacúolo central, cobertos com um quepe gelatinoso nas extremidades medindo 8-17 x 3,3-8 μm . Segundo Sivanesam (1984), pseudoparáfises são encontradas em pseudotécios maduros.

De acordo com Johnston & Fullerton (1988), as formas anamorfa e teleomorfa geralmente são encontradas associadas. As estruturas de frutificação da forma assexuada (*Phyllosticta citricarpa*) são representadas pelos picnídios (do tipo *Phoma* sp), que macroscopicamente são pequenos, globosos, pretos e semi eruptivos. Em corte vertical eles são globosos, com 70 a 330 μm de diâmetro, com parede marrom escura e células pseudoparenquimatosas.

A colônia cresce lentamente, atingindo diâmetro de 7 cm em 20 dias, em vários meios de cultura, a 20°C, e o micélio fortemente pigmentado é submerso, formando uma crosta plectenquimatosa. As células conidiogênicas são cilíndricas, com cerca de 4-8 x 2-3,5 μm . O conídio é unicelular, ovóide, elíptico ou subgloboso, algumas vezes clavado quando jovem, com uma base truncada, contendo gútulas, com um apêndice apical de 5 a 15 μm de comprimento, que segundo Punithalingam (1982) é característico de espécies de *Phyllosticta* e facilmente perdido. O mesmo autor descreve uma membrana gelatinosa recobrimdo os conídios, que serve de proteção contra o ressecamento durante a dispersão.

O estado de microconídio, *Leptodothiorella* Höhnelt sensu Sydow ex descrito por Van Der AA (1973), ocorre tanto em cultura *in vitro* como no hospedeiro e freqüentemente se desenvolve simultaneamente com a fase imperfeita do fungo. Possui corpos de frutificação semelhantes aqueles da fase conidial. Os microconídios (espermácios) medem 5-8 x 0,5-1 μm e possuem forma de haltere, cilíndricos, ligeiramente curvados, e são bigutulados nas extremidades entumecidas. Tanto conídios como microconídios podem ser formados simultaneamente na mesma cavidade

picnidial, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento. No entanto o microconídio não tem qualquer função vegetativa e não germina em meio artificial.

2.3. Genes e Fatores Envolvidos com a Interação Fungo-Planta

A patogenicidade de um fungo deve ser conferida pela presença de diversos genes, controlando uma seqüência complexa de eventos que ocorrem durante a infecção, incluindo aqueles requeridos para formação do apressório, que promove a penetração direta através da cutícula da planta hospedeira. A penetração da parede pelo patógeno, pode ser decorrente apenas de ação mecânica como em *Magnaporthe grisea* (Valent & Chumley, 1991), como também pode ter a participação de enzimas que degradam a parede celular. Segundo Annis & Goodwin (1997), os genes *cutAB1* de *Alternaria brassicicola* (Yao & Köller, 1995) e *cut* de *Colletotrichum gloeosporioides* (Dickman & Patil, 1986; Pascholati et al., 1993; Kolattukudy et al., 1995), que codificam para a cutinase (um tipo de enzima extracelular), são alvos no estudo da patogenicidade de um fitopatógeno. Exemplos de genes envolvidos na penetração via eventos mecânicos são dados pelos genes *alb1*, *rsy1* e *buf1* de *M. grisea* (Chumley & Valent, 1990), *scd1* (Kubo et al., 1996), *pks1* (Takano et al., 1995) e *thr1* (Perpetua et al., 1996) de *Colletotrichum lagenarium*, que codificam enzimas essenciais para a biossíntese de pigmentos escuros, como melanina, requeridos para a penetração (Dean, 1997).

O sucesso da penetração na planta hospedeira pela maioria dos fungos, patogênicos ou não, depende da diferenciação de estruturas especializadas para infecção, chamadas de apressório (Kubo et al., 1996). Algumas espécies de *Colletotrichum*, *Magnaporthe* e *Phyllosticta* (Shaw et al., 1998) produzem apressório complexo e fortemente pigmentado com melanina. Este pigmento media a formação de uma pressão hidrostática essencial para a penetração mecânica (Howard & Ferrari, 1989; Bourett & Howard, 1990). O tratamento de conídios com inibidores de síntese de melanina, como Triciclazol e Piroquilon, resulta na produção de apressórios não pigmentados e não funcionais, acarretando a incapacidade do fungo em penetrar na planta (Woloshuk & Sisler, 1982; Bell & Wheeler, 1986; Dean, 1997).

Em fungos, a melanina é encontrada tanto dentro da parede celular, como também na forma de polímeros extracelulares formados no meio de cultura ao redor das células do fungo. Segundo Bell & Wheeler (1986) há pelo menos 3 evidências indicando que os materiais eletro-densos encontrados na parede celular são melaninas. Primeiro, somente as células melanizadas mostram grânulos eletro-densos na parede; as paredes de células hialinas são eletro-translúcidas. Segundo, a parede que é melanizada e eletro-densa em isolados selvagens é eletro-translúcida em mutantes albinos, mas um padrão normal de grânulos eletro-densos aparecem nestes mutantes, quando os precursores da melanina são adicionados ao meio de cultura. E terceiro, adicionando-se no meio de cultura concentrações não tóxicas de Triciclazole (inibidor de síntese de melanina), ocorre a eliminação ou diminuição acentuada de grânulos eletro-densos na parede celular, sem nenhuma outra modificação nestas células.

Outra categoria de genes estudados na interação planta-patógeno, são aqueles cujos efeitos são específicos a um determinado cultivar, e por isso recebem o nome de genes de avirulência. O modelo básico de compatibilidade proposto por Heath, segundo De Wit (1992), prediz que uma interação gene a gene desenvolve-se como uma resposta a pressão seletiva no hospedeiro após a compatibilidade básica ser atingida pelo patógeno via produção de fatores de patogenicidade. A pressão de seleção resulta na evolução de resistência hipersensitiva raça-específica, que é ativada pelo produto de um gene de avirulência (o elicitor raça específico), após interação com um receptor (o produto putativo de um gene de resistência) (De Wit, 1997).

O controle da resistência bem como da avirulência, de maneira geral, parece dar-se pela ação de dois genes. Segundo De Wit (1992), parece haver diferentes níveis de controle em interações do tipo gene a gene, pela presença de genes inibidores. Vários genes de avirulência já foram identificados em diversos sistemas, como: tomate - *Cladosporium fulvum*, onde inclusive um, o *avr-9*, já foi clonado (De Wit et al., 1993); em arroz - *Magnaporthe grisea* (Valent & Chumley, 1991), onde já foram descritos 4 genes de avirulência cultivar-específicos; e em alface - *Bremia lactucae*, sendo identificados 13 genes *avr* (Judelson & Michelmore, 1989). Além disso, em *Leptosphaeria maculans*, patógeno de *Brassica napus*, Pang & Halloran (1996)

encontraram alta herdabilidade (67,5 a 79,7%) para virulência, sugerindo assim que esta característica deve ser controlada por um número pequeno de genes.

Dessa forma, a patogenicidade de um fungo é controlada por diversos genes, sendo que alguns deles podem exercer uma função principal, sem a qual o fungo é incapaz de reconhecer, penetrar ou colonizar o hospedeiro. A ausência (genes de patogenicidade) ou presença (genes de avirulência) do gene funcional pode resultar em linhagens não patogênicas ou avirulentas, e tal variação pode ser detectada pelo estudo de marcadores moleculares. Recentemente, vários pesquisadores tem se dedicado ao estudo de correlações entre variações na patogenicidade, marcadores moleculares e compatibilidade vegetativa de isolados de uma espécie fúngica. Um exemplo, é o trabalho de Wright et al. (1996) com isolados de *Fusarium oxysporum* de cravo. Estes pesquisadores encontraram uma alta correlação entre agrupamentos obtidos com dados de patogenicidade, compatibilidade vegetativa e marcadores de RAPD. Até então, a classificação de *F. oxysporum* em *formae speciales* e raças era feita de acordo com o hospedeiro e o cultivar, respectivamente (tal classificação é adotada para a maioria dos fungos fitopatogênicos). Tais isolados variam com relação a patogenicidade e são indistinguíveis morfologicamente, e assim, sua validade como unidade taxonômica torna-se incerta.

Em 1985, Puhalla analisou a variabilidade genética e estudou a filogenia de *Fusarium* utilizando várias técnicas, entre elas, testes de VCG (grupo de compatibilidade vegetativa). Na ausência de estágio sexual, a troca de material genético deveria ser limitada a isolados compatíveis dentro de um VCG, tanto que cada VCG representaria uma população geneticamente isolada. Este método tem sido empregado para estudar a relação entre isolados de *F. oxysporum* de um grande número de hospedeiros e correlacionando com agrupamentos obtidos por marcadores moleculares. Seguindo esta linha, além do trabalho de Wright et al. (1996), Manicom et al. (1990) e Manicom & Baayen (1993) também verificaram a existência deste tipo de correlação utilizando RFLPs (Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição). Desta forma, o próximo passo segundo Wright et al. (1996), seria a classificação de isolados de *F. oxysporum* e de outros fungos, e a utilização destes marcadores como ferramenta de

diagnóstico, com o sequenciamento de um fragmento de RAPD e síntese de "primers" específicos para PCR.

Rodriguez & Redman (1997) fazem uma revisão sobre as bases bioquímicas e genéticas da relação planta-patógeno. Em *Ustilago maydis* esta relação tem sido demonstrada ser dependente da presença de genes "mating type" específicos (Bolker, 1998 e Durrenberger & Kronstad, 1999), enquanto a virulência de *Nectria haematococca* em plantas de ervilha está associada com a presença do gene da pisatina demetilase (Van Etten & Kistler, 1988).

Além destes estudos, outros pesquisadores tem se dedicado a identificação de marcadores relacionados a produção de exopolissacarídeos por microrganismos. Exopolissacarídeos (EPSs) são polissacarídeos encontrados no meio extracelular, podendo ser excretados na forma de mucilagem ou estarem ligados às paredes celulares formando cápsulas (Sutherland, 1985). Os EPSs podem ser homopolissacarídeos, compostos de um único tipo de unidade monossacarídica como monômero ou, segundo Sutherland (1985), podem ser heteropolissacarídeos, compostos por mais de um tipo de unidade monossacarídica.

Em muitos casos, os exopolissacarídeos podem fazer parte de uma estrutura complexa chamada de biofilmes, onde células de microrganismos de espécies diferentes agrupam-se (Morris et al., 1997). A grande diversidade de estruturas e de microrganismos produtores de exopolissacarídeos está relacionada com as diferentes funções desempenhadas por estas macromoléculas. Talvez a principal função na fisiologia microbiana seja a de promover a adesão das células formando agregados na forma de flóculos (Christensen 1989) e/ou na superfície do hospedeiro (Costerton et al., 1995). Esta adesão dos esporos fúngicos na superfície do hospedeiro é geralmente o primeiro passo no estabelecimento da interação planta-fungo com sucesso. A adesão é dependente de processos passivos ou ativos, sendo que a adesão passiva envolve a pré formação de materiais localizados na superfície do esporo, como por exemplo a mucilagem encontrada em *Phyllosticta ampellicida* (Kuo & Hoch, 1996a).

Em exemplo, é o fungo *M. grisea*, onde o contato do conídio resulta na hidratação e subsequente liberação de mucilagem que tem a função de aderência (Hamer

et al., 1988), que é essencial para o estabelecimento do fungo na superfície da planta antes de começar a infecção. Neste fungo, os principais constituintes bioquímicos desta mucilagem extracelular, com aparente propriedades de aderência, são polissacarídeos e proteínas ou glicoproteínas.

Em outros fungos como *Cochliobolus heterostrophus* (Braun & Howard, 1994), *Nectria haematococca* (Jones & Epstein, 1989) e *Colletotrichum musae* (Sela-Buurlage et al., 1991), a liberação ativa de material de adesão dos esporos necessita de um longo período e é dependente de processos metabólicos de propágulos fúngicos. Após a adesão no tecido hospedeiro, o esporo germina formando um tubo germinativo que quando estimulado a penetrar, diferencia-se no apressório. Em *C. graminicola*, a mucilagem que recobre o conídio é composta principalmente de glicoproteínas de alto peso molecular tendo carboidratos primários, manose e ramnose. Em diversos fungos tem sido detectadas várias atividades enzimáticas em sua mucilagem, como esterase, invertase, β -glucosidase, DNase e peroxidase.

Estudos preliminares com *P. ampellicida*, tem mostrado que os conídios tem um único requerimento para germinação, ou seja, eles devem aderir ao substrato para poder germinar (Kuo & Hoch, 1996a). A adesão é portanto, considerada um fator de virulência para patogenicidade contribuindo para o desenvolvimento de doenças (Nicholson & Epstein, 1991). A descoberta de que a adesão é um pré-requisito para germinação e infecção de importantes fitopatógenos, pode ser vital para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da doença.

A existência desses polissacarídeos confere às células também outras vantagens, como a proteção contra dessecação e outros estresses ambientais de forma a proteger as populações contra variações bruscas do macroambiente, e a retenção de íons e de nutrientes (Griffin et al., 1996; Bernhard et al., 1996; Van Alfen, 1989; Gacesa, 1998; Quintero & Weiner, 1995). Assim, além da função de adesão, uma segunda função biológica dos exopolissacarídeos bastante difundida na natureza, é o fator de virulência tanto para patógenos de plantas como de animais. Ao longo do curso de um processo de infecção parasitária, os exopolissacarídeos por serem hidrofílicos, criam um ambiente favorável ao crescimento do patógeno no interior da planta infectada e podem

agir como uma barreira protetora contra os compostos tóxicos produzidos pelo hospedeiro, sendo a síntese de exopolissacarídeos considerada como essencial para a virulência nesses casos (Leigh & Coplin, 1992).

O papel predominante do exopolissacarídeo em fitopatologia tem sido demonstrado nos processos fitopatológicos causados por bactérias, como: *Erwinia stewartii* em milho e por *Erwinia amylovora* em macieiras, pereiras e outras rosáceas. Os exopolissacarídeos stewartana e amilovorana respectivamente são nestes casos considerados como importantes fatores de virulência (Bernhard et al., 1996). Segundo Denny (1995), a disrupção por meio de transposons de genes envolvidos com a biossíntese de EPSs, resulta na perda ou no abrandamento dos sintomas causados pela infecção por *Erwinia stewartii*, *E. amylovora* e por *Xanthomonas axopodis* pv. *Citrumelo* nos respectivos hospedeiros.

2.4. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Várias técnicas tem sido empregadas para análise da variabilidade em microrganismos. As clássicas, utilizam a caracterização de fenótipos, a partir de características morfológicas ou bioquímicas, principalmente por auxotrofia, restringindo a possibilidade de se conduzir estudos populacionais e muitas vezes, de sistemática. Nas duas últimas décadas, várias técnicas baseadas em análise de proteínas e DNA, tem sido desenvolvidas.

Em 1990, Williams et al. descreveram uma nova classe de marcadores genéticos, os RAPDs. A técnica é baseada na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, onde a estratégia é utilizar oligonucleotídeos de 10-15 bases como iniciadores para amplificar o DNA genômico, utilizando a reação de polimerase em cadeia - PCR (Saiki et al., 1985).

Na técnica RAPD, a amplificação por PCR diferencia-se da PCR "gene específica" por utilizar apenas um oligonucleotídeo de sequência arbitrária, por reação. A amplificação ocorrerá quando coincidir desta mesma sequência oligonucleotídica reconhecer um sítio de complementariedade em uma das fitas e também o mesmo sítio, porém com orientação invertida, na outra fita da molécula de DNA, dentro do intervalo

limite da PCR - 4Kb, utilizando-se a Taq DNA polimerase (Williams et al., 1990). Os oligonucleotídios dispostos nas extremidades da sequência a ser amplificada fornecem a extremidade 3' livre para a atuação da Taq DNA polimerase. A reação é aquecida a 90-95°C, para desnaturação do DNA molde, sofre um resfriamento entre 36-42°C para permitir o anelamento dos oligonucleotídios aos sítios apropriados no DNA molde; e um novo aquecimento de 70-75°C para que a Taq DNA polimerase sintetize novas fitas de DNA, completando-se assim o primeiro ciclo de amplificação. Nos ciclos seguintes, os oligonucleotídios irão se ligar nas fitas originais de DNA e também nas sintetizadas nos ciclos anteriores.

Os produtos da amplificação são separados por eletroforese em gel de agarose, onde os fragmentos maiores migram mais lentamente. Cada banda de DNA amplificado é o resultado da interação entre o oligonucleotídio e o DNA molde (Williams et al., 1990). Os polimorfismos são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento em outro genótipo, os quais são devido a diversos fatores. Alterações na sequência de bases nas regiões complementares aos oligonucleotídios, eliminam um sítio de ligação do oligonucleotídio, e inserções de sequências entre os sítios de ligação dos oligonucleotídios, deixam o segmento molde maior que o limite da PCR (4 Kb), de forma que a amplificação não ocorre, sendo ambas mutações reconhecidas pela ausência da banda no gel. Inserções entre os sítios de ligação dos oligonucleotídios que não ultrapassem o limite da PCR, farão com que a amplificação ocorra, mas produzirá uma banda com peso molecular maior. Por outro lado, deleções entre os sítios de ligação dos oligonucleotídios farão com que a amplificação ocorra, produzindo uma banda de peso molecular menor.

Segundo Williams et al. (1993) o comprimento ideal do oligonucleotídio para amplificação em RAPD é em torno de dez bases, devendo seu conteúdo GC ser em torno de 50 a 70%, sendo no mínimo de 40%. Além disso, eles não devem conter sequências palindrômicas, a fim de evitar o autopareamento. No mesmo trabalho, Williams et al. ressaltam que as concentrações de oligonucleotídio, magnésio e DNA podem alterar tanto o número de bandas amplificadas, bem como sua intensidade. Outro

ponto a ser considerado a fim de obter-se reprodutibilidade dos resultados, é a eliminação do RNA nas amostras de DNA. Segundo Yoon & Glawe (1993), a contaminação com RNA pode alterar completamente o padrão de bandas.

O RAPD é uma técnica altamente sensível a diferenças de nucleotídeos entre o oligonucleotídeo e o molde de DNA, incluindo diferenças em um único nucleotídeo. Além disso, marcadores RAPD podem ser mapeados para regiões do genoma que são inacessíveis para análise de RFLP pela existência de DNA repetitivo (Williams et al., 1990; 1993; Wang et al., 1993). Outras vantagens desta nova técnica, segundo Micheltore et al. (1991) são a rapidez, e o não envolvimento de hibridação ou radioatividade. Além disso, requer pequena quantidade de DNA, não necessariamente de alta qualidade (Manulis et al., 1993), nenhum trabalho preliminar é necessário, e finalmente, uma maior quantidade de marcadores pode ser encontrada quando comparado ao RFLP (Megnegneau et al., 1993, e Williams et al., 1990). Segundo Welsh & McClelland (1990) uma das grandes vantagens deste método é que ele requer pouco conhecimento da bioquímica ou biologia molecular das espécies em estudo.

As principais aplicações do RAPD são o mapeamento, classificação de linhagens de uma espécie, caracterização molecular de populações e espécies, identificação de raças patogênicas, identificação de marcadores ligados a genes de interesse, estudos de genética de populações e epidemiologia, e na obtenção de marcadores para diagnóstico via PCR. Além disso, os marcadores de RAPD podem servir para diagnosticar diferentes níveis taxonômicos. Segundo Fungaro & Vieira (1998), pode-se obter bandas gênero-específicas, espécie-específicas e até clone-específicos. Bandas apropriadas como marcadores para diagnóstico podem ser utilizados como sondas para investigações taxonômicas ou para estimar quantitativamente a presença de certos genomas em uma determinada amostra (Fungaro & Vieira, 1998). A seguir são destacados alguns exemplos da sua aplicação no estudo de fitopatógenos e endófitos.

No gênero *Colletotrichum* o uso de marcadores RAPD tem sido útil na identificação de diferentes raças de *C. graminicola* na antracnose do sorgo (Guthrie et al., 1992), e na diferenciação de isolados de *C. truncatum* causador da antracnose em

soja (Vasconcelos et al., 1994). Em citros marcadores específicos tem sido usados como oligonucleotídios para PCR e identificação de raças virulentas de *Colletotrichum*, o fungo causador da queda prematura de frutos na Flórida (Liyanage et al., 1992). A diferenciação de patógenos também foi possível via RAPD entre linhagens do fungo *Leptosphaeria maculans* isoladas de crucíferas (Goodwin & Annis, 1991), e de *Brassica napus* (Schäfer & Wöstemeyer, 1992). Manulis et al. (1993), utilizaram com sucesso, 30 oligonucleotídios arbitrários para distinguir linhagens patogênicas e não patogênicas de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, obtidos de cravo (Manulis et al., 1994). Vinte e um isolados de *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* foram separados em dois grupos distintos por Crowhurst et al. em 1991, utilizando 14 oligonucleotídios. Ainda em *Fusarium*, Grajal-Martin et al., (1993) utilizaram marcadores de RAPD para caracterização da raça 2 de *F. oxysporum* f.sp. *pisi*.

Liu et al. (1995) encontraram padrões de RAPD úteis para uma rápida identificação dos endófitos *Acremonium lolii* e *A. coenophialum* e Liew & Irwin (1994) utilizando 13 oligonucleotídios, detectaram alta divergência genética (80%) comparando isolados de *Phytophthora megasperma* isolados de grão de bico oriundos da Austrália e da Espanha. Entretanto a separação em dois grupos através de 339 bandas de RAPD, não foi observada quando marcadores morfológicos foram utilizados, pois tais marcadores não detectaram variação entre os isolados, sugerindo que estes são menos sensíveis.

Meijer et al. (1994) encontraram alto coeficiente de similaridade (>80%) entre 47 isolados de *Phomopsis subordinaria* isolados de 8 localidades diferentes, o que não foi detectado quando 69 isolados procedentes de 23 locais, foram analisados por isoenzimas, sendo todos idênticos. Nicholson & Reznook (1994) detectaram variação entre isolados de *Pseudocercospora herpotrichoides* utilizando 10 oligonucleotídios ("primers"), enquanto Holmes et al. (1994) observaram apenas 10% de similaridade entre espécies patogênicas de *Penicillium* em citros. Quando estes autores compararam por meio de 6 oligonucleotídios, isolados de mesma espécie, verificaram altos coeficientes de similaridade variando de 84,4 a 100%.

Hulbert et al. (1988) e Judelson & Michelmore (1989) utilizaram o RAPD no estudo de linhagens patogênicas e não patogênicas do fungo *B. lactucae*, e

identificaram marcadores associados a genes de avirulência neste fitopatógeno. Utilizando 7 “primers” de RAPD, Glienke et al. (1995) encontraram alta variabilidade genética em isolados endofíticos de *G. citricarpa* de citros.

2.5. Clonagem e Sequenciamento

2.5.1. Vetores de Clonagem

Vetores de clonagem são geralmente plasmídios utilizados como veículos na clonagem de um fragmento de DNA, permitindo a introdução e multiplicação de uma seqüência em bactéria que será posteriormente selecionada e multiplicada. O desempenho de um vetor está relacionado à sua construção, isto é, as seqüências que foram introduzidas, conferindo propriedades particulares. Tais propriedades são resumidamente: a) Multiplicar-se ativamente na célula hospedeira, geralmente de forma episomal; b) Ser o menor possível, de maneira a permitir a inserção de fragmentos maiores de DNA, de manipular os recombinantes facilmente, e de obter rapidamente uma grande quantidade de cópias por célula hospedeira; c) Apresentar propriedades que permitam facilmente sua seleção nas células que o incorporam; d) Ser estável ao longo das gerações; e) Possuir o maior número possível de sítios de restrição facilitando as construções. Alguns destes sítios únicos devem estar localizados em genes de seleção (resistência a antibióticos) a fim de que a integração do DNA exógeno facilite a recuperação do recombinante; f) Ser facilmente isolado e purificado (Silva-Filho, 1995).

Os plasmídios são os vetores mais freqüentemente utilizados. Estes, são fragmentos circulares de DNA extracromossômico de origem bacteriana, com replicação autônoma e geralmente dispensáveis para as células. Possuem tamanhos variáveis, e quanto menor um plasmídio, mais rapidamente ele se duplica e maior quantidade pode estar presente numa bactéria (até várias centenas). Os plasmídios permitem a clonagem eficiente de fragmentos de DNA de até 8 Kb.

O Plasmídio pGEM-T Easy Vector (Apêndice 1) da PROMEGA possui 3018 pb e foi desenvolvido especialmente para clonagem de fragmentos originados por PCR. Isto deve-se ao fato de apresentar-se linearizado com resíduos de timina em suas

extremidades 3', sendo complementares ao resíduo de adenina encontrado nos fragmentos amplificados com a Taq DNA Polimerase. O plasmídio apresenta a origem de replicação do fago m13 (*ϕ*) o que permite a síntese de uma fita simples de DNA (utilizado em seqüenciamento). Possui dois promotores T3 e T7 para a RNA polimerase, uma região com sítios únicos de restrição (polycloning site) e um gene de seleção que codifica uma proteína que confere resistência à ampicilina. Permite distinguir uma colônia transformada por um plasmídio recombinante, por possuir a parte 5' do gene lacZ que codifica para a extremidade amino terminal da β-galactosidase. A introdução deste plasmídio em uma célula mutante de *Escherichia coli* que não apresenta o gene lacZ, permite a formação da β-galactosidase ativa. As colônias transformadas podem ser diretamente selecionadas utilizando-se um substrato cromogênico (X-GAL : 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactose). Para tanto, as bactérias são cultivadas em presença de IPTG (isopropil-β-galactosidase, um indutor não metabolizado do operon da lactose) e de X-gal, galactosídeo sintético no qual sua cor passa do incolor ao azul quando ele é clivado pela β-galactosidase. Assim, as colônias transformadas lacZ⁺ são azuis e as lacZ⁻, brancas. O gene lacZ possui uma região interna de múltiplos sítios de clonagem, permitindo a inserção do DNA exógeno, interrompendo o gene lacZ e tornando as bactérias transformadas lacZ⁻. Os clones transformados por um plasmídio recombinante serão resistentes à ampicilina e brancos. Os clones transformados por um plasmídio não recombinante serão resistentes à ampicilina e azuis. Os clones não transformados serão suscetíveis à ampicilina.

2.5.2. Sequenciamento

Um dos métodos de sequenciamento mais utilizados, é o sequenciamento de DNA dupla fita com dideoxynucleotídeos, conforme metodologia enzimática descrita por Sanger et al. em 1977. A base deste método é o uso de dideoxirribonucleosídeos trifosfatos, nos quais o grupo 3'-OH da desoxirribose, presente em nucleotídeos normais, está faltando. Quando um destes nucleotídeos modificados é incorporado em uma cadeia de DNA, a adição do nucleotídeo seguinte é bloqueada. Assim, o dideoxi

ATP (ddATP) compete com um excesso de desoxi ATP (dATP), de modo que cada nova fita de DNA sintetizada pela DNA polimerase num tubo de ensaio terminará em um A da sequência, selecionado aleatoriamente. O mesmo ocorre nos tubos contendo ddTTP, ddCTP e ddGTP. Assim, esta reação gera uma população de fragmentos de DNA, que são separados por tamanho na eletroforese em gel de poliacrilamida, e detectados pela marcação radioativa.

2.6. Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Fragmentos de DNA acima de 60 Kb não podem ser separados por eletroforeses convencionais, pois as moléculas migram com a mesma velocidade (Maniatis et al., 1982). Entretanto, em 1984 Schwartz & Cantor demonstraram que tais moléculas poderiam ser separadas se submetidas a uma variação cíclica de orientação do campo elétrico no gel durante a corrida. Esta variação leva as moléculas de DNA a se reorientarem, sendo o tempo de reorientação diretamente proporcional ao seu tamanho. Esta técnica passou a ser chamada Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis), e permite a separação de moléculas de DNA de 50 a 10.000 Kb (10 Mb).

Parâmetros dos mais diversos podem influenciar o perfil de resolução eletroforética, devendo considerar as suas interações para a otimização de um protocolo para um determinado organismo. Segundo Pizzirani-Kleiner & Mühlen (1998) e Wrestler et al. (1996), os fatores mais importantes são: voltagem, temperatura, tipo e concentração da agarose, tipo e concentração do tampão, concentração do DNA e de sais, ângulo de reorientação e homogeneidade do campo elétrico. Para auxiliar na escolha dos parâmetros iniciais a serem testados, Wrestler et al. (1996) elaboraram uma série de tabelas e gráficos, que sugerem condições de corridas eletroforéticas em função do tamanho estimado do genoma do organismo em questão.

A técnica de separação de cromossomos por PFGE é extremamente trabalhosa pois além dos inúmeros parâmetros a serem testados, a técnica para a grande maioria dos microrganismos, exige inicialmente a obtenção de grande quantidade de

protoplastos. Protoplastos são células cuja parede celular foi removida pelo auxílio de enzimas líticas (Novozyme²³⁴ e celulasas, entre outras), em solução osmótica adequada, que pode variar de organismo para organismo. A preparação de protoplastos se faz necessária a fim de obter-se os cromossomos intactos, o que não é possível com as técnicas convencionais de extração de DNA.

Em fungos rotineiramente utilizados em laboratório, como *Aspergillus nidulans*, a obtenção de protoplastos é relativamente simples. Porém em fungos patogênicos, esta pode ser uma etapa limitante na obtenção do cariótipo eletroforético, uma vez que tais fungos apresentam parede celular mais resistente à ação de enzimas líticas (Dantas-Barbosa et al., 1998). Tal resistência é ainda mais pronunciada naqueles fungos que apresentam em sua parede celular, pigmentos semelhantes à melanina. Tais pigmentos são conhecidos por conferir maior resistência a seus portadores, contra o ataque de fungos produtores de enzimas líticas, muito comuns no solo (De Cal & Melgarejo, 1994).

Uma vez obtidos os protoplastos, a próxima etapa é a inclusão destes em pequenos géis de agarose (“plugs”), lise destes e eliminação das proteínas celulares com tratamento dos “plugs” em solução tampão com proteinase K. Após purificação destes “plugs”, os mesmos são inseridos nas canaletas de gel de agarose e submetidos aos mais variados protocolos de eletroforese em campo pulsado.

Diferentes sistemas eletroforéticos são atualmente disponíveis para separação de moléculas de alto peso molecular. Mühlen (1995) faz uma excelente revisão sobre o assunto. Os mais comumente utilizados são: CHEF (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field), FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis), OFAGE (Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis) e TAFE (Transverse Alternating Field Electrophoresis).

O surgimento desta técnica revolucionou o estudo citogenético da maioria dos fungos, sendo possível a elaboração de um cariótipo eletroforético (o genoma em bandas cromossômicas) determinando o número e o tamanho dos cromossomos (Skinner et al., 1991). Com esta técnica já foram obtidos os cariótipos eletroforéticos de vários microrganismos, entre eles: *Saccharomyces cerevisiae* (Carle & Olson, 1984),

Cephalosporium acremonium (Skatrud & Queener, 1989), *Candida* spp (Magee & Magee, 1987), *Ustilago maydis* (Kinscherf & Leong, 1988), *Neurospora crassa* (Orbach et al., 1988), *Aspergillus nidulans* (Brody & Carbon, 1989; Montenegro et al., 1992), *Colletotrichum gloeosporioides* (Masel et al., 1990), *Phytophthora megasperma* (Howlett, 1989), *Cladosporium fulvum* (Talbot et al., 1991), *Fusarium oxysporum* (Kistler & Momol, 1990), *Metarhizium anisopliae* (Shimizu et al., 1992; Kava-Cordeiro, 1993), *Paecilomyces farinosus* (Shimizu et al., 1993), *Lasioderma serricorne* e *Stegobium paniceum* (Noda & Kawahara, 1995), *Leptosphaeria maculans* (Howlett, 1997).

A técnica de eletroforese em campo pulsado tem sido também utilizada para estudos de polimorfismos entre isolados de uma mesma espécie fúngica. Assim, cromossomos supernumerários ou cromossomos "B" foram detectados em *Nectria haematococca* (Miao et al., 1991), *M. grisea* (Skinner et al., 1993), *Schizosaccharomyces pombe* (Niwa et al., 1986) e *C. gloeosporioides* (Masel et al., 1990). Um alto grau de polimorfismo também foi detectado entre "mini-cromossomos" (menores que 2 Mb) entre diferentes isolados do mesmo fungo (Masel et al., 1990; Orbach et al., 1988). Em um trabalho subsequente, Orbach et al. (1996) associam a presença de mini-cromossomos em *M. grisea*, com baixos níveis de fertilidade sexual. Entretanto, segundo os autores, esses cromossomos pequenos, designados de cromossomos B, parecem não ser essenciais para o crescimento e patogenicidade das linhagens que os possuem. Outro caso interessante foi descrito por Martin (1995). Estudando espécies de *Pythium*, o autor encontrou associação entre polimorfismo do cariótipo eletroforético de *P. spinosum* e instabilidade meiótica neste fungo.

Em *Leptosphaeria maculans* grandes diferenças foram encontradas entre isolados que acreditava-se pertencerem a mesma espécie, e que diferiam apenas pelo grau de virulência (Taylor et al., 1991). Variações no número e tamanho de minicromossomos também foram encontrados no cariótipo eletroforético de *Botrytis cinerea* (VanKan et al., 1993), e Xu et al. (1995) utilizaram o cariótipo eletroforético para distinção de espécies biológicas de *Gibberella fujikuroi*. Variações nos cromossomos como as duplicações, deleções, translocações, também podem ser

identificadas fisicamente em linhagens de uma mesma espécie por meio do cariótipo eletroforético, que também tem sido utilizado como auxiliar na taxonomia (Jonge et al. 1986). He et al. (1998) utilizaram esta técnica para o estudo da transferência de cromossomos supernumerários em *Colletotrichum gloeosporioides* entre biótipos com incompatibilidade vegetativa.

Segundo Pizzirani-Kleiner & Mühlen (1998), a eletroforese em campo pulsado também pode ser utilizada para o mapeamento de genoma bacteriano, na cariotipagem em leveduras industriais, na análise de genomas artificiais de leveduras (YACs), na análise de clones de YACs, nas estratégias para mapeamento de grandes regiões do genoma humano, e de DNA repetitivo humano e na construção de bancos de grandes fragmentos de lambda.

Outra aplicação desta técnica, é a localização de genes pela hibridação em géis provenientes da eletroforese em campo pulsado. Desta forma, genes envolvidos na patogenicidade de *N. haematococca* foram localizados em um cromossomo de 1,6 Mb (Miao et al., 1991; Van'Ettem et al., 1994; Kim et al., 1995). Um gene que codifica para t-RNA ligase de *Candida albicans*, isolado de uma biblioteca genômica pela complementação de um mutante de *S. cerevisiae*, foi localizado no cromossomo 1 (o menor) por hibridação em gel de eletroforese em campo pulsado. Os cromossomos individualizados em um gel também podem ser hibridados com um gene marcado, para a localização deste após uma transformação genética, visando a conformação desta e a distinção entre integração e não integração, bem como inserção homóloga ou heteróloga (Fungaro et al., 1995; Foutz et al., 1995; Tudzynski et al., 1996).

2.7. Obtenção de Mutantes

O estudo da genética de muitos processos fisiológicos em microrganismos fitopatogênicos, tem sido dificultado muitas vezes pela falta de mutantes geneticamente definidos. Isto deve-se ao fato de muitos fungos filamentosos serem multinucleados em parte ou em todo o seu ciclo de vida, dificultando a análise de mutantes. Linhagens mutantes podem ser empregadas em estudos básicos ou então podem ser obtidas linhagens de interesse aplicado, como mutantes para alta produção de antibióticos

(penicilina), para produção de enzimas como amilase e celulasas para utilização industrial.

Os principais tipos de mutantes utilizados em genética de microrganismos são os mutantes auxotróficos, resistentes a agentes inibidores, morfológicos, mutantes incapazes de utilizarem certas fontes de nitrogênio ou carbono e os mutantes para produção de determinadas substâncias extracelulares.

2.7.1. Mutantes auxotróficos

São mutantes que necessitam de um meio de cultivo completo para crescer, isto é, um meio rico contendo peptona, caseína, extrato de leveduras, soluções de ácidos nucleicos e vitaminas. Em oposição, sua linhagem original ou selvagem é prototrófica, ou seja, é capaz de crescer em meio de cultivo sólido constituído apenas por sais minerais e uma fonte de carbono chamado de meio mínimo ou definido. Os mutantes auxotróficos são incapazes de sintetizar algum componente do meio completo e que não está presente no meio mínimo, provavelmente devido a alguma mutação em um gene responsável pela produção deste componente (Fincham et al., 1979). Tais mutações podem ser obtidas pela utilização de agentes mutagênicos físicos, por exemplo a luz ultravioleta (com comprimento de onda de 2.500 Å) (Bagagli et al., 1991; Pamphile, 1992; Kava-Cordeiro, 1993), ou mutagênicos químicos como o EMS (Etilmetanosulfonado) (Magoon & Messing-Al-Aidroos, 1986), DES (Dietilsulfato) (Goldman, 1988; Pimentel, 1991) e Ácido Nitroso (Siddiqi, 1962, Azevedo, 1970; Goldman, 1988; Kava-Cordeiro, 1993).

2.7.2. Mutantes Morfológicos

São mutantes que diferem do tipo selvagem por apresentarem modificações na coloração, tamanho ou formato da colônia. Ocorre grande número de mutantes para conidiação e em outras estruturas reprodutivas (Fincham et al., 1979), sendo geralmente mutações induzidas. Porém uma classe de mutantes morfológicos que vem chamando muita atenção entre os fitopatologistas, são os mutantes albinos de fungos patogênicos originalmente produtores de pigmentos. Tais mutantes são

deficientes para a produção de melanina devido a mutações em genes que codificam para síntese de enzimas essenciais nesta via.

Melanina é um grupo de pigmentos que variam de marrom escuro a preto, e que podem ser largamente encontrados em animais, plantas e microrganismos. Os diversos tipos de melanina são definidos em função dos precursores envolvidos na sua biossíntese. DOPA melanina é formada em animais pela oxidação da tirosina pela dihydroxyphenilalanina (DOPA). Em basidiomicetos, dois tipos de melanina são encontrados, a melanina γ -glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno (GDHB, em *Agaricus brunescens*) e a melanina catecol (em *Ustilago maydis*). A melanina 1,8-dihidroxinaphthaleno (DHN) ocorre em muitos ascomicetos e deuteromicetos. A DHN é derivada da via acetato policetide (Apêndice 2).

Bell & Wheeler (1986) definem melanina extracelular como a melanina sintetizada completamente aparte da parede celular. Em culturas em meio líquido com agitação, a melanina extracelular formada pela auto oxidação (no meio externo) pode aderir a parede do fungo, dando uma falsa impressão que a melanina é ligada a parede celular. Segundo Bell & Wheeler (1986), a oxidação de compostos fenólicos presentes no meio ocorre por enzimas secretadas pelo fungo. Fungos e bactérias que secretam tirosinases freqüentemente causam descoloração do meio de cultura contendo peptonas ou caseína hidrolizada. A secreção de fenóis por fungos pode não descorar o meio por umas poucas semanas, mas após diversos meses o meio ao redor de certos fungos tornam-se fortemente pigmentados, especialmente em pH superior a 7,0.

Os apressórios dos fungos *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum* spp e *Phyllosticta ampellicida* são fortemente pigmentados pela presença de melanina. Em *Magnaporthe grisea*, mutantes no gene *buf1* são albinos e incapazes de infectar plantas desprovidas de ferimentos (Valent & Chumley, 1991). Porém, segundo Dean (1997), tais mutantes quando inoculados diretamente no interior do tecido foliar, são completamente virulentos. Os mutantes albinos aparecem espontaneamente em meio de cultura, sendo que segundo Valent & Chumley (1991) cerca de 0,5% dos conídios produzidos por qualquer isolado de *M. grisea*, carrega tal mutação. Por outro lado, mutantes no gene *alb1* são raramente encontrados espontaneamente. Tal instabilidade encontrada na

pigmentação dos isolados não é exceção, sendo também encontrados setores para patogenicidade e fertilidade. Tais mosaicos são encontrados em grande número quando isolados recentes são cultivados em meio de cultura e tendem a diminuir com os sucessivos repiques (Valent & Chumley, 1991).

Ao contrário de *M. grisea* e *Colletotrichum* spp, o apressório de *Cochliobolus* spp são fracamente pigmentados e pobremente diferenciados. Morfologicamente, eles não são distintos de tubos germinativos, apenas tem seu diâmetro aumentado. Mutantes deficientes para melanina neste fungo, ainda possuem capacidade de infecção.

Segundo Bell & Wheeler (1986) em vários fungos a produção de melanina está relacionada com a diferenciação celular. Assim, Triciclazole em concentrações que inibem a síntese de melanina também inibe o desenvolvimento normal de estruturas de reprodução ou de apressório. Mutantes albinos também apresentam redução ou ausência na produção de esporos mas não na produção de apressórios funcionais. Estas observações indicam, segundo Bell & Wheeler (1986) que a melanina pode proporcionar rigidez às complexas estruturas do fungo, mas não necessariamente para a diferenciação de células especializadas. Em *Ophiostoma piliferum* os mutantes albinos também não são capazes de produzir peritécios maduros. Quando a pigmentação destas linhagens é restaurada pela adição de scitalone (um intermediário na síntese de DHN), a capacidade de produzir peritécios e ascósporos, também é restaurada. Parece que a melanina pode ter um papel estrutural no desenvolvimento, porém neste fungo, a melanina não é requerida para a penetração e colonização do hospedeiro.

Segundo Zimmermam et al. (1995) quando um mutante albino estéril cresce em meio de cultura contendo extrato de uma linhagem pigmentada scitalone, o mutante também passa a produzir pigmento e o peritécio. O fato de o mutante albino restaurar a pigmentação quando crescido em meio contendo scitalone ou o extrato do fungo pigmentado (que produz scitalone), mas permanecer albino mesmo com tirosina, ácido shikimico e catecol, significa que a biossíntese da melanina neste fungo é via DHN (1,8-dihidroxinaftaleno).

Os inibidores de síntese de melanina, Triciclazole e Piroquilon, podem ser úteis na elucidação de vias de pigmentos em fungos, bem como o estudo de mutantes deficientes para produção de melanina. O entendimento dos processos de formação do apressório, será útil no controle de doença de plantas. O sucesso de fungicidas anti-penetrantes, que interferem com a biossíntese de melanina para controle de doenças fúngicas, é um bom exemplo.

2.7.3. Outros Tipos de Mutantes

Muitas vezes quando uma linhagem fúngica é exposta a um agente inibidor a qual é sensível, poderão surgir mutantes resistentes que crescerão e formarão colônias isoladas. Tais agentes inibidores podem ser fungicidas, corantes e outras drogas como higromicina, ciclohexamida e acriflavina (Fincham et al., 1979). Tais mutantes podem ser obtidos espontaneamente quando em contato com o agente inibidor ou induzidos por exposição a agentes mutagênicos.

Pode-se obter também, mutantes incapazes de utilizar determinada fonte de carbono, como lactose e galactose ou nitrogênio, como nitrato ou nitrito. Geralmente necessitam de indução e são muitas vezes selecionados indiretamente em um sistema chamado por Fincham et al. (1979) como Seleção de Mutantes em Dois Passos.

Em fungos muitos produtos são liberados para o meio extracelular e são recuperados no meio de cultivo. Muitos mutantes são maiores produtores destes produtos, como o antibiótico penicilina (*Penicillium chrysogenum*); vitaminas; enzimas, como amilases e pectinases; e exopolissacarídeos de interesse industrial.

2.8. Sistemas de Transformação Genética

No estudo dos processos de infecção e trabalhos baseados na complementação funcional para o isolamento de genes de patogenicidade, uma das principais limitações a ser resolvida para muitos fungos fitopatogênicos é um eficiente protocolo de transformação (Dean, 1997). Vários autores, como Kwon-Chung et al. (1998) tem registrado a dificuldade em transformar fungos patogênicos utilizando as mais diversas técnicas. O sucesso do processo de transformação em fungos filamentosos

depende de pelo menos cinco etapas: obtenção de células competentes (capazes de captar o DNA); o vetor de transformação; o transporte do vetor ao núcleo; propagação e expressão do vetor; e um método eficiente de identificação das células transformadas. Após a entrada do DNA no núcleo, este precisa ser duplicado juntamente com a célula e em seguida, os genes seletivos devem ser transcritos e traduzidos em proteínas funcionais, permitindo assim, a seleção dos transformantes.

Em geral, a maioria dos eventos de transformação em fungos filamentosos envolve a integração do DNA transformante no genoma nuclear da célula receptora. O DNA integrado se duplica e é transcrito junto com o DNA da célula receptora. A integração pode ocorrer em um único ou em vários sítios, como simples ou múltiplas cópias, e em sítios específicos ou ao acaso (Timberlake & Marshall, 1989). Diolez et al. (1993) desenvolveram um sistema de transformação homólogo para *F. oxysporum* utilizando o gene *nia* para nitrato redutase, e verificaram uma alta frequência de transformação (600 transformantes/ μ g de DNA), com integração homóloga, não homóloga e troca gênica.

Os sistemas de transformação tem sido empregados com diversos objetivos como, estudo da interação fungo-planta e disrupção gênica para estudo de diferentes genes, principalmente relacionados a patogenicidade. Marmeisse et al. (1993) empregaram a transformação de protoplastos para a disrupção do gene de avirulência *avr9* em *Cladosporium fulvum*, utilizando mutantes auxotróficos para pirimidina (*pyrG*⁻). Silva et al. (1996) transformaram protoplastos de *N. crassa* para promover a disrupção de um gene nuclear que codifica para uma subunidade da NADH: ubiquinona redutase, e Apel et al. (1993) para a disrupção do gene *xyl1* que codifica para xilanase de *Cochliobolus carbonum*. Herd et al. (1997) utilizaram isolados endofíticos de *Acremonium* sp. co-transformados com *gus* (gene da β -D-glucuronidase de *E. coli*) para monitoração da distribuição espacial deste endófito na planta. Maor et al. (1998) transformaram o fungo *Cochliobolus heterostrophus* patógeno de milho, com um vetor contendo um gene para síntese de uma proteína com fluorescência verde, para o estudo do desenvolvimento do fungo e sua interação com o hospedeiro.

2.8.1. Métodos de Transformação Genética

Principalmente no que diz respeito a fungos filamentosos (que tem a entrada do DNA exógeno dificultada pela espessa parede celular que apresentam), a obtenção de protoplastos parece ser uma etapa essencial para uma maior eficiência de transformação. As células competentes, são derivadas de micélio, conídios ou conídios germinados (Fincham, 1989). Existe portanto, a necessidade de se romper pelo menos duas barreiras potenciais, a membrana plasmática e a nuclear. Uma das dificuldades adicionais na transformação de fungos, é que ao contrário dos demais eucariontes superiores, a membrana nuclear não desaparece durante a mitose (Grotelueschen & Metzenberg, 1995).

Os protocolos mais freqüentemente utilizados, envolvem a remoção enzimática da parede celular do micélio ou conídio, gerando protoplastos osmoticamente sensíveis. A parede celular é normalmente removida por complexos de enzimas digestivas, tal como a Novozyme 234, em tampão osmótico. Os protoplastos se formam por extrusão do citoplasma, através dos poros gerados pela remoção da parede celular ou, pelo micélio desprovido de parede celular. Protoplastos formados por extrusão do citoplasma, formam uma população que varia quanto ao número de núcleos e demais constituintes citoplasmáticos. Já os protoplastos formados a partir de micélio ou conídios inteiros, que tiveram a parede celular retirada, devem conter todos os componentes citoplasmáticos necessários para regeneração e teoricamente representam uma população mais competente que a anterior (Davis, 1985). Porém, são mais difíceis de serem obtidos.

A estabilidade osmótica dos protoplastos é mantida pelo emprego de sais, como sulfatos de magnésio e amônio, cloretos de magnésio e potássio, e açúcares, como sorbitol e sacarose. Variações nesses métodos tem sido aplicadas por muitos grupos e adaptadas às mais variadas espécies. A competência dos protoplastos é normalmente medida pela eficiência de transformação, a qual refere-se ao número de transformantes obtidos por micrograma de DNA do vetor, sendo que uma pequena porcentagem de células expostas ao DNA exógeno sofre transformação.

Assim, a qualidade dos protoplastos e sua capacidade de regeneração podem ser consideradas fatores responsáveis pelo sucesso de uma transformação. Normalmente, ocorre a formação de uma população mista de protoplastos grandes e pequenos. Skatrud et al. (1987) verificaram que os protoplastos maiores regeneraram melhor suas paredes celulares que os pequenos. Estes protoplastos pequenos geralmente são anucleados ou até mesmo, perderam muitos de seus componentes citoplasmáticos durante a exposição às enzimas líticas (Tebeest & Weidman, 1990). A idade da cultura é outro fator importante, sendo os tecidos jovens, em crescimento exponencial, capazes de captar mais DNA que tecidos mantidos por um longo período em cultura (Dickman, 1988). Judelson et al. (1993) também verificaram que a utilização de hifas jovens minimiza a frequência de protoplastos vacuolados em *B. lactucea*.

A idade da cultura, o estabilizador osmótico e as enzimas líticas foram os grandes responsáveis pelo sucesso da produção e regeneração de um grande número de protoplastos, obtidos a partir de conídios, em *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* por Tebeeste & Weidman (1990). Um pré-tratamento dos conídios com β -mercaptoetanol (0,1%), EDTA (0,1M) e cisteína (0,1%), promoveu a protoplastização de 50% dos conídios, contra 18% dos que não sofreram o pré-tratamento antes da adição das enzimas líticas. Segundo os autores, provavelmente este aumento na protoplastização deve-se ao β -mercaptoetanol. Quanto ao estabilizador osmótico, a sacarose, KCl e o $MgSO_4$ mostraram os melhores resultados para regeneração (80-84%).

Após a obtenção das células competentes, estas precisam estar livres de enzimas nucleolíticas, as quais degradam o DNA. Resíduos de enzimas líticas e qualquer lise celular, que ocorre durante o preparo dos protoplastos, resultam em liberação de nucleases. Tais nucleases extracelulares podem ser removidas por sucessivas lavagens dos protoplastos com tampão osmótico (Rodriguez & Redman, 1992).

A adição de estabilizador osmótico à solução de PEG {polietileno glicol [α -hydro- ω -hydroxy-poly(oxy-1,2-ethanediyl)]}, usada na incubação dos protoplastos em processo de transformação, aumentou a frequência de regeneração de 9 a 18% em *Acremonium* sp. (Murray et al., 1992). Goettl et al. (1990) transformaram *Metarhizium anisopliae* com o gene de resistência ao benomil e verificaram que os protoplastos

transformados não regeneraram quando misturados diretamente com o meio de seleção. Assim, a incubação dos transformantes na ausência de seleção por um período de 18 a 24 horas, parece ser importante para que haja expressão da resistência almejada. A adição da droga logo após a transformação pode resultar na inibição de prováveis transformantes enquanto, um atraso na adição pode resultar na inibição do crescimento do transformante, pela regeneração e crescimento de protoplastos não transformados.

A eletroporação é outro método que tem sido empregado para promover a entrada de DNA em protoplastos de fungos filamentosos, como *Fusarium solani*, *A. nidulans* (Richey et al., 1989) e *N. crassa* (Chakraborty & Kapoor, 1990). Quando uma célula é exposta a um campo elétrico, os componentes da membrana ficam polarizados e surge uma diferença de potencial através da membrana. Se a voltagem excede o nível limiar, a membrana rompe-se em áreas localizadas e as células ficam permeáveis a moléculas exógenas. Esta permeabilidade induzida é reversível, se a magnitude ou duração do campo elétrico não exceder o limite crítico (Shigekawa & Dower, 1988). Não existe um padrão elétrico médio estabelecido para a eletroporação. Para estabelecer parâmetros para um novo sistema deve ser considerado o tamanho da célula, a sua viabilidade após o choque ser desferido e a condutividade do meio de eletroporação (Goldman et al., 1990).

Goldman et al. (1990) reportaram a transformação de *Trichoderma harzianum* usando pulsos de alta voltagem para promover a competência das células. Foram obtidos, em média, 400 transformantes/ μ g de DNA, uma frequência comparável a obtida por métodos usando CaCl_2 e PEG, e com transformantes extremamente estáveis (100% após 5 gerações de crescimento em meio não seletivo).

Um dos primeiros métodos alternativos, que não necessita da preparação de protoplastos, é o emprego de altas concentrações de acetato de lítio em combinação com PEG, para induzir a permeabilidade das células intactas ao DNA exógeno. Inicialmente desenvolvido para *S. cerevisiae* (Ito et al., 1983), esse método foi estendido para *N. crassa* (Dhawale et al., 1984), *Coprinus lagopus* (Benninger et al., 1987) e *Colletotrichum trifoli* (Dickman, 1988).

Recentemente Dantas-Barbosa et al. (1998) transformaram conídios germinados de *Humicola grisea* tratados com acetato de lítio, com gene para resistência a higromicina B, e obtiveram 32 transformantes por μg de DNA plasmidial, ml stando maior eficiência de transformação para este fungo do que os métodos convencionais. Além disso, os transformantes obtidos pelo método de Acetato de Lítio, foram mais estáveis e apresentaram um número superior de cópias do gene *hph* integrados no genoma, quando comparados com o método de Eletroporação de Protoplastos (Dantas-Barbosa et al., 1998). Este protocolo às vezes apresenta baixa eficiência de transformação, mas constitui-se numa alternativa para fungos que apresentam problemas na remoção da parede, como os fortemente pigmentados, ou na viabilidade de protoplastos.

Células intactas também podem ser transformadas por disparos de microprojéteis revestidos com ácidos nucleicos, que atravessam parede e membrana celulares. Os microprojéteis utilizados são partículas de ouro ou tungstênio, e o método conhecido como biolística ou bombardeamento de partículas, requer um aparelho apropriado, o acelerador de partículas. Este método, que foi descrito inicialmente para plantas, não utiliza protoplastos e tem provado ser eficiente para transformar células intactas de leveduras e fungos (Armaleo et al., 1990). Em fungos filamentosos tem sido utilizado tanto micélio (Bayley et al., 1993) quanto conídios (Hilber et al., 1994; Fungaro et al., 1995).

Bayley et al. (1993) transformaram micélio de *Phytophthora* spp com bombardeamento de partículas, utilizando um plasmídeo contendo os genes da β -glucuronidase e para resistência a higromicina B. Os resultados mostraram que pode-se obter transformantes estáveis, a partir de micélio e que o DNA atinge eficientemente, as células-alvo. O maior problema no entanto, reside no fato de que muitos fungos apresentam micélio multinucleado, inclusive *Phytophthora* spp e *Guignardia* spp e durante a transformação o DNA pode atingir apenas um dos núcleos, gerando transformantes instáveis. Quando Bayley et al. (1993) avaliaram a atividade GUS (β -glucuronidase) em zoósporos de *Phytophthora* spp, verificaram que a expressão desse gene quimérico era possível, mas havia uma diferença na intensidade de coloração para

a atividade GUS e tal diferença não podia ser eliminada por transferências dos setores, que apresentavam a coloração, para meio seletivo. Este padrão heterogêneo pode ser efeito da segregação genética devido a presença de vários núcleos no micélio.

Para evitar problemas de instabilidade de transformantes, devido a presença de micélio multinucleado, Hilber et al. (1994) transformaram por biolística, conídios do fitopatógeno *Botryotinia fuckeliana*. Eles demonstraram que a eficiência de transformação não foi afetada pela pressão de hélio, concentração de sorbitol ou tamanho da partícula. Além disso, um período de 17 horas entre o bombardeamento e a adição do meio seletivo, necessário para a reparação de danos mecânicos, não alterou a eficiência de transformação. Fungaro et al. (1995) também transformaram conídios de *A. nidulans argB-*, com o plasmídio pFB39. Em ambos os experimentos de transformação de conídios, foi possível comprovar por Southern blot que o DNA integrou-se no genoma do fungo. Já nos experimentos com micélio, verificou-se uma alta taxa de duplicação autônoma dos plasmídios (Fungaro et al., 1995).

2.8.2. Marcadores Seletivos Dominantes

Os sistemas de transformação em fungos tem sido consideravelmente estudados desde que foram descritos para *S. cerevisiae* (Hinnen et al. 1978) e *N. crassa* (Case et al., 1979). Por muitos anos, o desenvolvimento de sistemas de transformação para fungos filamentosos de importância econômica e industrial era limitado pela falta de linhagens geneticamente bem definidas, com mutações auxotróficas para serem complementadas pelo alelo selvagem introduzido. Entretanto, os mutantes se tornam desnecessários se o vetor de transformação carregar um gene dominante selecionável nas linhagens transformadas (Turgeon et al., 1985). As principais marcas dominantes utilizadas tem sido: resistência a antibióticos (higromicina B, fleomicina, oligomicina e bleomicina), resistência ao ácido 5-fluorótico (FOA), resistência a fungicidas (benzimidazóis), sulfonamidas e a utilização de acetamida como fonte de nitrogênio.

Uma das maiores vantagens de se utilizar marcadores seletivos dominantes é que o genótipo não precisa ser conhecido. A frequência de transformação obtida com genes de resistência não é muito alta, quando comparada aos marcadores

auxotróficos. Isto porque a maioria das colônias com crescimento vigoroso facilmente detectadas em meio seletivo, freqüentemente contém integração de múltiplas cópias do plasmídio sendo mais rara a integração de cópias únicas (Turner, 1994). Por isso, esse tipo de marcador tem sido utilizado preferencialmente em fungos onde é difícil obter um grande número de mutações e a disponibilidade de cruzamento sexual, para construir combinações favoráveis, é restrita.

O gene *amdS* de *A. nidulans*, que codifica acetamidase, uma enzima que converte acetamida a acetato e amônia, permitindo consequentemente o crescimento em acetamida como fonte de nitrogênio, tem sido viável na transformação de *Cochliobolus heterostrophus*, um patógeno de milho (Turgeon et al., 1985). Um marcador quimérico, consistindo de um promotor de *C. heterostrophus* fusionado ao gene *hygB* (higromicina B fosfotransferase) de *E. coli*, que confere resistência ao antibiótico higromicina B aos transformantes, foi empregado na transformação de uma série de fungos, incluindo *C. graminicola*, *L. maculans* e *N. haematococca* (Turgeon et al., 1987). Em 1987, Punt et al. também transformaram o fungo *Aspergillus* com o plasmídio para resistência a higromicina B, e obtiveram 5 a 20 transformantes por micrograma de DNA do vetor. Staben et al. (1989) utilizaram com sucesso a resistência a higromicina B como marcador dominante na seleção de transformantes do fungo *N. crassa*, utilizando os plasmídios pAN7.1, pDH25, pCSN43 e pCSN44. A higromicina B é um aminoglicosídeo que inibe a síntese protéica por erros na tradução e interferindo com o transporte protéico (Gonzalez-Vila et al. 1978 e Peng et al. 1992). A resistência (*hyg^r*) é conferida pelo gene *hph* cujo produto atua inativando a higromicina B por fosforilação. Este marcador apresenta vantagens pelo fato de a mutação espontânea *hyg^r* não ser muito alta, não interferindo assim com a seleção (Staben et al., 1989).

Usando o gene *amdS* de *A. nidulans* e o gene *hygB* de *E. coli* como marcadores seletivos, Rodriguez & Yoder (1987) transformaram *G. cingulata* (anamorfo: *C. lindemuthianum*). A transformação ocorreu por integração de cópias únicas e múltiplas, de ambos os plasmídios, no genoma do fungo. Apesar dos mutantes serem mitoticamente estáveis em meios seletivos e não seletivos, a eficiência de transformação foi baixa (0,2 colônia/ μ g de DNA plasmidial). Tais transformantes foram

capazes de infectar feijão e após a recuperação dos tecidos infectados, os autores observaram que as plantas hospedeiras mantinham o fungo transformado.

Blackmore et al. (1989) reportaram a transformação de *Pseudocercospora herpotrichoides* usando dois métodos positivos de seleção, um baseado na resistência a higromicina B e outro na resistência ao benomil. O gene *hygB* foi neste caso expressado sob o controle de sinais de expressão dos genes *gpd* e *trpc* de *A. nidulans*. O gene *bml* (resistência ao benomil de *N. crassa*) representa outro gene heterólogo (neste caso de origem fúngica), que pode ser expressado em *P. herpotrichoides*. Os resultados mostraram eventos similares de integração para ambos os vetores, apesar de *bml* ter uma maior homologia com o *P. herpotrichoides*. Ambos os vetores apresentaram integração de múltiplas cópias, sendo provavelmente uma integração em sítios não homólogos. A análise mitótica mostrou estabilidade (quanto a taxa de crescimento e morfologia) para os transformantes obtidos com o plasmídeo pAN7.1 (gene *hygB*) e uma instabilidade com crescimento alterado, dos transformantes obtidos com o plasmídeo pBT₃ (gene *bml*).

Em 1991, Cooley et al. utilizaram o gene de resistência ao benomil clonado de *Septoria nodorum* para transformação de *L. maculans*, sugerindo que os genes para β -tubulina são altamente conservados entre Ascomicetos e Deuteromicetos, não sendo um fator determinante da eficiência de transformação.

Uma das vantagens da ampla utilização do sistema utilizando o gene *bml*, é o seu custo reduzido e a disponibilidade do benomil no mercado. Além disso, sendo o benomil largamente aplicado como um agente antifúngico, ocorrem naturalmente linhagens resistentes das quais poderiam ser isolados os genes para construção de sistemas homólogos. Os estudos mostram que os benzimidazóis bioativos são inibidores específicos dos microtúbulos, atuando na molécula heterodimérica da tubulina, a principal proteína componente dos microtúbulos. Porém, vários Ascomicetos adquirem resistência ao benomil, quando cultivados em meio de cultura contendo este fungicida. Segundo Davidse (1986), tal resistência tem sido atribuída a mutações nos genes que codificam para a subunidade β da tubulina.

Pilgeram & Henson (1990) utilizaram a resistência a fleomicina como marcador seletivo na transformação de *Gaeunaromyces graminis*. Fleomicina é um antibiótico que interage com o DNA de organismos suscetíveis, clivando preferencialmente as repetições invertidas e os sítios não metilados. Este sistema de transformação foi desenvolvido para servir de base nos estudos dos determinantes patogênicos e das interações hospedeiro-parasita nesses organismos. Os resultados mostraram que a integração das seqüências ocorreu em diferentes sítios e com vários números de cópias no genoma do fungo, não sendo observada correlação entre número de cópias e o tipo de vetor utilizado (circular ou linear), mas segundo Pilgeram & Henson (1990), houve correlação entre número de cópias e resistência ao antibiótico, o fenótipo dos transformantes foi estável mitoticamente, durante crescimento em meio não seletivo e os transformantes mostraram-se com o mesmo potencial fitopatogênico dos selvagens.

Sanchez-Fernandez et al. (1991) interessados em estudar a via biossintética das giberelinas (hormônios de crescimento em plantas), transformaram *Giberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*), um fungo utilizado comercialmente na produção desse hormônio, com o gene de nitrato redutase (*niaD*) de *Aspergillus niger*. Com uma freqüência de transformação de 1-2 transformantes/ μ g de DNA, os autores mostraram a possibilidade de se usar esse sistema heterólogo para transformação. A análise de “Southern blot” mostrou uma freqüência alta de integração do vetor em um único sítio no DNA cromossomal.

Marmeisse et al. (1993) utilizaram a resistência ao FOA como marcador dominante na seleção de transformantes do fungo *Cladosporium fulvum*. Inicialmente estes autores obtiveram mutantes auxotróficos para pirimidina após exposição a luz ultravioleta. Tais mutantes são sensíveis ao FOA, assim, após a transformação com o gene *pyrG*, os transformantes foram selecionados entre os resistentes ao FOA.

2.8.3. O Plasmídio pCSN43

O pCSN43 contém um sítio Sall de 2.4 Kb do plasmídio pDH25 clonado no sítio Sall do pBSSK+ (Stratagene), e contém o gene para resistência a ampicilina em

bactérias e o gene para resistência a higromicina B (Hygromycin B phosphotransferase) de *Escherichia coli*, controlado pelos sinais de transcrição PtrpC e TtrpC do fungo *Aspergillus nidulans* (Apêndice 3), para seleção em fungos (Staben et al. 1989). Segundo os autores, este plasmídeo tem a vantagem de apresentarem alta taxa de replicação na bactéria *E. coli*, proporcionando facilidade de propagação.

2.9. Microscopia Ótica e Eletrônica de Varredura

Como descrito anteriormente, a presença dos endófitos tem sido demonstrada principalmente pelo isolamento de fungos após a esterilização superficial dos tecidos e crescimento dos microrganismos em meio de cultura apropriado, mas outros métodos também têm sido empregados, como por exemplo, microscopias óptica e eletrônica. Trabalhos utilizando microscopia de luz e mais recentemente, eletrônica (SEM e TEM), tem não apenas detectado a presença de fungos no interior dos hospedeiros, mas também mostrado a sua localização, e esclarecido o processo de penetração dos endófitos nas plantas (Viret & Petrini, 1994). White Jr. et al. (1993) usando técnicas de coloração e microscopia ótica, detectaram a presença de micélio no espaço intercelular de folhas, sementes e talos, de *Festuca arundinaceae* (gramínea). Wilson et al. (1991), demonstraram a presença de hifas endofíticas em folhas e sementes de cinco espécies de *Lolium*, e em 1985 White & Cole evidenciaram hifas crescendo intercelularmente em sementes de *F. arundinaceae* e *F. arizonica*.

Os microscópios eletrônicos mais utilizados em estudos biológicos são os de transmissão (MET) e o de varredura (MEV). Quando comparado ao microscópio óptico, o eletrônico é muito mais caro, mais complicado e mais trabalhoso, porém possui um poder de resolução muito superior. Tal resolução é variável e é devida ao feixe de elétrons com comprimento de onda muito menor que o da luz visível, fornecendo imagens nítidas de objetos muitas vezes menores do que as obtidas com o microscópio óptico (Nogueira & Barroso, 1998). O feixe de elétrons é formado pela aceleração dos elétrons emitidos termo-ionicamente por um filamento de tungstênio aquecido até a incandescência, por uma corrente elétrica. No MEV, o feixe de elétrons interage com o

espécime, induzindo a liberação de elétrons dos átomos de sua superfície. Os elétrons liberados (elétrons secundários) são coletados por um detector e induzem a formação da imagem, com aparência tridimensional e com grande profundidade de foco, em um monitor de televisão.

Porém, para permitir a observação em MEV, o espécime precisa ser preparado adequadamente. Tal preparação possui várias etapas, que podem ser resumidas em: a) fixação do material (geralmente em glutaraldeído); b) lavagem; c) pós-fixação em tetróxido de ósmio; d) secagem ao ponto crítico; e) montagem em suporte; f) cobertura com metal (geralmente ouro). O poder de resolução do MEV varia entre 3 a 0,1 nm.

3. METODOLOGIA

3.1. Meios de Cultura

3.1.1. Meio Mínimo (MM) (Pontecorvo et al., 1953, pH modificado):

NaNO ₃	6,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g
Glicose	10,0g
Água Destilada	p/ 1.000,0 ml

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1N.

Para MM sólido acrescentou-se 1,5% de ágar DIFCO.

3.1.2. Meio Completo (MC) de Pontecorvo, modificado por Azevedo & Costa (1973) (pH modificado):

Meio Mínimo adicionado de:

Peptona	2,0g
---------	------

Extrato de Levedura	2,0g
Caseína Hidrolisada	1,5g
Solução de Vitaminas	1,0 ml

O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1N.

Para MC sólido acrescentou-se 1,5% de ágar.

3.1.3. Meio MCT

Meio completo 2X concentrado, diluído em mesmo volume de tampão osmótico Manitol 1,2 M (item 3.2.20).

3.1.4. Meio MEASP (Modificado de Paterson & Bridge, 1994)

Extrato de Malte	20,0 g
Glicose	10,0 g
Água Destilada	p/ 1.000,0 ml

O pH foi ajustado com NaOH 1N ou HCl 1N, quando necessário.

3.1.5. Meio YEPD

Glicose	20,0 g
Peptona	20,0 g
Extrato de Levedura	10,0 g
Água Destilada	p/ 1.000,0 ml

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 1N.

3.1.6. Meio LB (Sambrook et al., 1989)

Triptona	10,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
NaCl	10,0 g
Água Destilada	p/ 1.000,0 ml

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1N. Para meio sólido acrescentou-se 1,5% de ágar.

3.1.7. Meio Ágar-Água:

Ágar	15,0 g
Água Destilada	p/ 1000,0 ml

3.1.8. Meio Glicose:

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Caseína Hidrolisada	1,5 g
Solução de Vitaminas	1,0 ml
Glicose	10,0 g
Água Destilada	p/1000,0 ml

O pH variou em sete unidades, de 3,5 à 9,5.

3.1.9. Meio Sacarose:

Preparado conforme o Meio Glicose (item 3.1.2), substituindo-se a glicose por 10,0 g de sacarose.

Todos os meios foram autoclavados à 1 atm por 20 minutos.

3.2. Soluções e Tampões

3.2.1. Acetato de Lítio

Acetato de Lítio	102,0 mg
Água Milli-Q autoclavada	p/ 10,0 ml

3.2.2. Acetato de Sódio 3M pH 5,2

Acetato de Sódio	40,81 g
Água Milli-Q	p/ 100,0 ml

O pH foi acertado com ácido acético glacial, e o volume foi completado com água Milli-Q para 100 ml.

3.2.3. Ácidos nucleicos

Solução A

Ácido nucleico de levedura	2,0 g
HCl 1N	15,0 ml

Solução B

Ácido nucleico de levedura	2,0 g
----------------------------	-------

NaOH 1N	15,0 ml
---------	---------

As soluções A e B foram misturadas e aquecidas a 98°C por 15 minutos, e o pH ajustado para 6,0 com NaOH 1N. Completou-se o volume para 40 ml com H₂O destilada esterilizada e armazenou-se a solução a 4°C.

3.2.4 Aminoácidos

Caseína Hidrolisada	0,1 g
Água destilada autoclavada	p/ 10,0 ml

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e mantida a 4°C.

3.2.5. Brometo de Etídio (Sambrook et al, 1989)

Foi dissolvido 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitado por várias horas e estocado à temperatura ambiente.

3.2.6. Clorofane

Fenol	100,0 ml
Clorofórmio	100,0 ml

3.2.7. Clorofil

Clorofórmio	240,0 ml
Álcool Isoamílico	10,0 ml

3.2.8. EDTA 50 mM pH 8,0

EDTA	7,44 g
------	--------

Água Milli-Q	p/ 400,0 ml
--------------	-------------

3.2.9. EDTA 500 mM pH 8,0

EDTA	37,22 g
------	---------

Água Milli-Q	p/ 200,0 ml
--------------	-------------

3.2.10. Fenol saturado (Sambrook et al., 1989), modificado.

Foram dissolvidos em banho-maria a 60°C 50g de fenol cristalizado, e adicionado um volume de tampão Tris-HCl 0,2M pH=8,0. Após agitação de 30 minutos retirou-se a fase aquosa e repetiu-se o procedimento até o fenol atingir pH 8,0. Em seguida, adicionou-se 1/10 do volume final de tampão Tris-HCl 0,2M pH=8,0 e o estocou-se em frasco escuro a 4°C.

3.2.11. Gel de agarose (0,8%)

Agarose A-0169 (Sigma)	0,8 g
------------------------	-------

Tampão TEB 1x	100,0 ml
---------------	----------

3.2.12. Gel de agarose (1,5%)

Agarose A-0169 (Sigma)	1,5 g
------------------------	-------

Tampão TEB 1x	100,0 ml
---------------	----------

3.2.13. Gel de agarose para PFGE (0,8%)

Agarose A2929 (Sigma)	0,8 g
-----------------------	-------

Tampão TBE 1x	100,0 ml
---------------	----------

3.2.14. Gel de agarose para PFGE (1,0%)

Agarose A2929 (Sigma)	1,0 g
Tampão TBE 1x	100,0 ml

3.2.15. Gel de agarose "LGT" (1,4%)

Agarose A4018 (Sigma)	0,014 g
Tampão Osmótico	1,0 ml

3.2.16. Gel de Poliacrilamida Desnaturante 6%

Solução Acrilamida 30% e Bis 0,9%	6,0 ml
TAE 50x	0,6 ml
TEMED 10%	0,06 ml
Persulfato de Amônio	0,05 ml
Água Milli-Q	21,4 ml

3.2.17. Hidrato de Chloral (Bruzzese & Hasan, 1983):

Hidrato de chloral	25,0 g
Água destilada	10,0 ml

3.2.18. IPTG

IPTG	0,48 g
N'N'Dimetilformamida	10,0 ml

3.2.19. Manitol 0,6 M pH 5,8

Manitol	109,32g
Solução A de TF 0,2 M pH 5,8	500,0 ml

Adicionou-se a solução B de TF 0,2 M pH 5,8 até atingir o pH 5,8, e completou-se o volume para 1.000 ml com TF 0,2 M pH 5,8. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

3.2.20. Manitol 1,2 M pH 5,8

Manitol	218,64 g
Solução A de TF 0,2 M pH 5,8	500,0 ml

Adicionou-se a solução B de TF 0,2 M pH 5,8 até atingir o pH 5,8, e completou-se o volume para 1.000 ml com TF 0,2 M pH 5,8. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

3.2.21. MgSO₄ 1,2 M pH 5,8

MgSO ₄	29,58 g
Solução TF 0,01 M pH 5,8	p/ 100,0 ml

Esterilizada por filtração.

3.2.22. NaCl 5M

NaCl	58,44 g
Água Milli-Q	p/ 200,0 ml

3.2.23. NDS

EDTA pH 8,0	500 mM
Tris-HCl pH 9,5	10 mM
N-Lauroylsarcosinato de Sódio	1% (p/v)

No momento do uso acrescentou-se 1 mg de Proteinase K por ml de solução.

3.2.24. RNase

Foi preparada na concentração de 10 mg/ml, em 10 mM de Tris-HCl (pH=7,5) e 15 mM de NaCl, aquecida a 100°C por 15 minutos e estocada a -20°C.

3.2.25. Salina 0.85% (p/v)

NaCl	8,5 g
Água destilada	p/ 1.000,0 ml

A solução foi distribuída em frascos com 9 ml, autoclavada e mantida a 4°C.

3.2.26. Solução A para Transformação Fúngica (SATF)

CaCl ₂	0,1 M
Manitol	0,6 M
Tris-HCl pH 7,5	0,01 M

3.2.27. Solução B para Transformação Fúngica (SBTF)

CaCl ₂	0,1 M
Manitol	0,6 M

Tris-HCl pH 7,5	0,01 M
PEG 8000	25%

3.2.28. Solução A para Transformação Bacteriana (SATB)

Tris-HCl	10 mM pH7,5
CaCl ₂	50 mM

3.2.29. Solução B para Transformação Bacteriana (SBTB)

Tris-HCl	10 mM pH7,5
CaCl ₂	50 mM
Glicerol	15%

3.2.30. Solução A para Plasmídio

Glicose	0,05 M
Tris-HCl	0,025 M
EDTA	0,010 M

O pH foi ajustado para 8,0 com NaOH 1N.

3.2.31. Solução B para Plasmídio

SDS	1%
NaOH	0,2 M

A solução foi preparada no momento do uso a partir de uma solução estoque de 20% e 2M, de SDS e NaOH respectivamente, armazenadas em tubo plástico.

3.2.32. Solução C para Plasmídio

Acetato de Potássio 5M	60,0 ml
Ácido Acético Glacial	11,5 ml

3.2.33. Solução Clareadora (Bruzzeze & Hasan, 1983):

Etanol 95%	300,0 ml
Clorofórmio	150,0 ml
Ácido Láctico 90%	125,0 ml
Fenol	150,0 g
Hidrato de chloral	450,0 g
Azul de anilina	0,6 g

3.2.34. Solução Desnaturante

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 N

3.2.35. Solução Neutralizante

Tris-HCl pH 7,4	1,0 M
NaCl	1,5 M

3.2.36. Sorbitol 0,6 M

Sorbitol	10,93 g
Tris 0,1 M pH 7,5	p/ 100,0 ml

3.2.37. SSC 20x

NaCl	175,3 g
Citrato de Sódio	88,2 g
Água Milli-Q	p/ 1.000,0 ml

3.2.38. Tampão da amostra (6x)

Azul de bromofenol	250,0 mg
Ficoll	15,0 g
Água Milli-Q	p/ 100,0 ml

3.2.39. Tampão de corrida TAE 10X

Tris Base	48,4 g
Ácido Acético Glacial	11,42 g
EDTA 0,5 M	20,0 ml
Água Milli-Q	p/ 1.000,0 ml

3.2.40. Tampão de corrida TEB 10x pH8.0

Trizma base	54,0 g
Ácido bórico (H_3BO_3)	27,5 g
EDTA	4,65 g
Água Milli-Q	p/ 500,0 ml

A solução foi autoclavada e mantida a temperatura ambiente.

3.2.41. Tampão de extração de DNA (Raeder & Broda, 1985)

Tris-HCl pH 8.0	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS (p/v)	1 %

3.2.42. Tampão Fosfato (TF) 0,2 M pH 5,8**Solução A**

NaH_2PO_4	0,2 M
---------------------------	-------

Solução B

Na_2HPO_4	0,2 M
---------------------------	-------

As soluções A e B foram autoclavadas e mantidas a 4°C, sendo o tampão fosfato preparado no momento do uso, misturando aproximadamente 80 ml da solução B em 920 ml da solução A, até atingir pH 5,8.

3.2.43. Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl (pH=8,0)	10 mM
EDTA (pH=8,0)	1 mM

3.2.44. Tampão S

Sorbitol	1,2 M
Citrato de Sódio	0,05 M
Fosfato de Sódio	0,05 M
pH 5,6	

3.2.45. Tampão W

Tampão S acrescido de EDTA 40 mM.

3.2.46. Tween 80 0,1% (v/v)

Tween 80	0,1 ml
----------	--------

Água destilada	p/ 100,0 ml
----------------	-------------

A solução foi distribuída em tubos de ensaio com 2,5 ml, autoclavada e mantida a 4°C.

3.2.47. Vitaminas:

Ácido nicotínico	100,0 mg
------------------	----------

Ácido p-aminobenzóico	10,0 mg
-----------------------	---------

Biotina	0,2 mg
---------	--------

Piridoxina	50,0 mg
------------	---------

Riboflavina	100,0 mg
-------------	----------

Tiamina	50,0 mg
---------	---------

Água Milli-Q esterilizada	p/100,0 ml
---------------------------	------------

A solução foi aquecida a 100°C em banho-maria por 15 minutos, e guardada em frasco escuro a 4°C sob clorofórmio.

3.2.48. X-GAL

X-Gal	0,2 g
-------	-------

Água Milli-Q	p/ 10,0 ml
--------------	------------

Esterilizado por filtração.

3.3. Plasmídios

O plasmídio pCSN43 (Apêndice 3) foi gentilmente cedido pelo Dr. Walter Maccheroni Júnior (ESALQ/USP).

3.4. Amostras Foliares

As amostras foliares foram obtidas conforme metodologia descrita por Glienke (1995), e coletadas no Rio Grande do Sul (Porto Alegre), Paraná (Rio Negro e Toledo) e São Paulo (Cordeirópolis, Rio Preto, Novais e Olímpia).

3.5. Material Biológico

3.5.1. *Escherichia coli* DH5 α F' (Sambrook et al., 1989)

Gentilmente cedida pelo laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

3.5.2. *Escherichia coli* DH510B

Gentilmente cedida pelo laboratório de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica da UFPR.

3.5.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Gentilmente cedida pelo laboratório de Leveduras do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

3.5.4. *Guignardia* spp

Os isolados foram gentilmente cedidos ou isolados conforme Tabela 1. Os isolados de *G. citricarpa*, foram obtidos de lesão de Mancha Preta dos Citros e

denominados de patógenos, ou isolados do interior de folhas saudáveis (item 3.6) e denominados de endófitos. Os isolados de *Guignardia* sp foram obtidos de folhas saudáveis de guaraná ou eucalipto, sendo denominados de endófitos. Os isolados de *G. psidii* foram obtidos de lesão de goiabeira. No total foram utilizados 104 isolados, assim distribuídos:

- * 36 isolados patogênicos de citros (sul e sudeste brasileiro)
- * 59 isolados endofíticos de citros (sul e sudeste brasileiro)
- * 4 isolados endofíticos de citros (Tucumán - Argentina)
- * 4 isolados endofíticos de guaraná (Manaus)
- * 9 isolados patogênicos de goiabeira (*G. psidii*)
- * 1 isolado endofítico de eucalipto (SP)
- * 1 linhagem referência de *G. citricarpa* (CBS 111.20).

Tabela 1: Origem e classificação dos isolados de *Guignardia* spp:

ISOLADO	HOSPEDEIRO	LOCAL	TIPO	ANO	OBS
EC1, EC15, EC45, EC210	Tangerina Poncã	Cordeirópolis – SP	ENDÓFITO	94	2
EC145, EC224, EC320	Tangerina Cravo	Cordeirópolis – SP	ENDÓFITO	94	2
EC4, EC86, EC131, EC216	Tangor Murcote	Cordeirópolis – SP	ENDÓFITO	94	2
EC68, EC80, EC171	Tangerina Mexerica	Cordeirópolis – SP	ENDÓFITO	94	2
EC86S	Setor do EC86	-----	ENDÓFITO	95	---
ECA175, ECA196, ECA 245	Citros – Genova	Tucumán – Argentina	ENDÓFITO	98	3
ECA63	Limão	Tucumán – Argentina	ENDÓFITO	98	3
ECALG116, ECAF7.5	Limão	Tucumán – Argentina	PATÓGENO	98	3
ECN1 a ECN22	Laranja	Novais – SP	ENDÓFITO	97	2
ECOL23	Laranja	Olímpia – SP	ENDÓFITO	97	2
ECPOA1 a ECPOA8	Laranja	Novo Hamburgo –RS	ENDÓFITO	97	2
ECPR1 a ECPR12	Limão	Rio Negro – PR	ENDÓFITO	97	2
ECPR14 e ECPR16	Laranja	Rio Negro – PR	ENDÓFITO	97	2
ECRP1 a ECRP6	Limão	Ribeirão Preto – SP	ENDÓFITO	97	2

ECTO1	Tangerina	Toledo – PR	ENDÓFITO	97	2
EENI2	Eucalipto	Piracicaba – SP	ENDÓFITO	97	7
EG1Z a EG4Z	Guaraná	Manaus – AM	ENDÓFITO	96	4
PC1, PC2, PC4, PC16	Limão	Cordeirópolis – SP	PATÓGENO	96	1
PC13	Limão	Mogi-Guaçu – SP	PATÓGENO	96	1
PC18	Limão	Cordeirópolis – SP	PATÓGENO	96	1
PC19	Limão	Cordeirópolis – SP	PATÓGENO	96	1
PCC2, PCC4, PCC5, PCC9	Citros	Cordeirópolis – SP	PATÓGENO	96	1
PC23	Setor do 13	---	PATÓGENO	96	1
PC45, PC48, PC50, PC58	Limão	Cordeirópolis – SP	PATÓGENO	97	1
PC4S	Setor do C4	-----	PATÓGENO	97	---
PC7L	Limão	Mogi-Guaçu – SP	PATÓGENO	96	1
PC7LS	Setor do PC7L	-----	PATÓGENO	96	---
PC97005	Citros RS		PATÓGENO	97	8
PC97007	Citros RS		PATÓGENO	97	8
PC97008	Citros RS		PATÓGENO	97	8
PC97010	Citros RS		PATÓGENO	97	8
PC97012	Citros RS		PATÓGENO	97	8
PC97013	Citros RS		PATÓGENO	97	8
PC97014	Citros RS		PATÓGENO	97	8
PCFM	Citros / Falsa Melanose	Cordeirópolis – SP	PATÓGENO	95	1
PCP1 a PCP10	Citros / Falsa Melanose	Cordeirópolis – SP	PATÓGENO	96	1
PCRJ1 a PCRJ3	Citros	Rio de Janeiro	PATÓGENO	95	9
PG1435 a PG1515	Goiaba	Brasília – DF	PATÓGENO	93	5

-
1. Isolado e cedido pelo IAC - Carlos Ivan Aguilar Vildoso
 2. Isolado neste trabalho
 3. Cedido gentilmente pela Dra. Estela Durán – Tucumán, Argentina
 4. Isolado e cedido gentilmente pelo Dr. José Odair Pereira - UFAM
 5. Cedido gentilmente pelo Dr. Luimar José Tozetto – UnB
 6. Cedido gentilmente pelo CBS (Central Bureau Schimmelcultures)
 7. Cedido gentilmente pelo Departamento de Fitopatologia ESALQ/USP
 8. Cedido gentilmente pelo Departamento de Fitossanidade da UFRGS
 9. Cedido gentilmente pelo Dr. Antonio de Góes

3.6. Isolamento de Fungos Endofíticos

Os fungos endofíticos de citros foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por Glienke (1995). As folhas foram superficialmente desinfetadas por meio de imersão em Etanol 70% por 1 minuto, tratamento com NaOCl 3% por 4 minutos e posterior lavagem com Etanol 70% por 30 segundos. Após a esterilização externa, as folhas foram cortadas assepticamente em 5 fragmentos (5-7mm), e estes transferidos para placas de Petri contendo meio completo (MC) (item 3.1.2) adicionado de tetraciclina (100 µg/ml) para impedir o crescimento bacteriano, e incubados a 28°C. As placas foram observadas diariamente quanto ao aparecimento de isolados de *G. citricarpa*, que foram transferidos para tubos com MC inclinado, e incubados a 28°C.

3.7. Manutenção do Estoque

Folhas de citros foram autoclavadas com água destilada a 1 atm por 20 minutos, e cortadas em fragmentos de aproximadamente 1cm² colocados em placas de Petri com meio Ágar-Água (item 3.1.7), sendo 5 fragmentos por placa. Em pontos próximos aos fragmentos de folha foram repicados fragmentos do micélio fúngico (um isolado por placa), que cresceram em direção à folha e esporularam sobre ela. Após 21 dias de crescimento a 28°C, os fragmentos foliares cobertos de esporos foram colocados em pequenos frascos (tipo Eppendorf) contendo sílica previamente autoclavados e foram estocados a 4°C.

Quando necessário, um fragmento foliar contendo esporos foi retirado da sílica e inoculado em placa com meio MC (item 3.1.2).

3.8. Obtenção de Solução de Esporos

Aproximadamente 15 placas do isolado fúngico com 15 a 25 dias de crescimento foram utilizadas para obtenção dos esporos. As colônias foram raspadas com auxílio de espátula e as estruturas diluídas em Tween 80 (item 3.2.46) e maceradas

com auxílio de bastão de vidro esterilizado, a fim de romper os picnídios e liberar os esporos. A solução foi então filtrada em seringa com lã de vidro.

3.9. Análise da Variabilidade Genética por RAPD

3.9.1. Extração de DNA

Dois métodos de extração de DNA foram testados:

3.9.1.1. Método Convencional (Raeder & Broda, 1985)

O fungo foi crescido em meio MEASP (item 3.1.4) por aproximadamente 4 dias, sendo então o micélio filtrado em funil com papel de filtro com auxílio de bomba a vácuo. O micélio foi triturado com adição de nitrogênio líquido, e após, a cada grama de micélio foram acrescentados 4 ml de tampão de extração (item 3.2.41), e a mistura incubada por 20 minutos a 70°C. A desproteínização foi realizada em 3 passos: tratamento com fenol saturado (item 3.2.10), Clorofane (item 3.2.6) e Clorofil (item 3.2.7). Cada tratamento foi seguido de centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos e coleta da fase aquosa. Os ácidos nucleicos foram então precipitados com Etanol absoluto por 1 hora a -20°C. Após este período, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante desprezado, e o precipitado lavado com Etanol 70%, e finalmente, os tubos invertidos para a secagem do DNA. Este foi ressuscitado cuidadosamente em 100 µl de tampão TE (item 3.2.43) e tratado com RNase (50µg/ml) a 37°C por 1 hora. Foi então repetido o tratamento com Clorofil. À fase aquosa acrescentou-se 10% de Acetato de Sódio 3M (item 3.2.2) e 2 volumes de Etanol P.A. Seguiu-se então a precipitação, secagem e ressuspensão do DNA conforme descrito acima. O DNA obtido foi quantificado em gel de agarose 0,8% (item 3.2.11).

3.9.1.2. Método Liofilizado

O fungo foi crescido em meio MC sólido (item 3.1.2), a 28°C por dois a três dias. O micélio foi coletado com auxílio de uma espátula e liofilizado por 48 horas,

após as quais foi triturado com adição de nitrogênio líquido. O protocolo restante, segue o Método convencional (item 3.9.1.1).

3.9.2. Amplificação do DNA (PCR)

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador *MJ Research* nas condições determinadas para *G. citricarpa* por Glienke (1995), sendo cada reação submetida a 40 ciclos após desnaturação inicial a 92°C por 4 min. Cada ciclo consistiu de 1 min. a 92°C, 1 min. e 30 seg. a 37°C e 2 min a 72°C. Os ciclos foram seguidos de uma extensão final de 3 min. a 72°C. Os "primers" utilizados foram o OPX8 (5'CAGGGGTGGA3'), OPX11 (5'GGAGCCTCAG3'), OPX12 (5'TCGCCAGCCA3'), OPX14 (5'ACAGGTGCTG3'), OPX17 (5'GACACGGACC3') e OPX19 (5'TGGCAAGGCA3') da Operon Technologies.

3.9.3. Análise de Polimorfismo

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,5% (item 3.2.12), corados por 15 minutos com brometo de etídio (item 3.2.5), e descorados por 40 minutos em água destilada. O gel foi fotografado sob luz UV em transiluminador. Os marcadores de peso molecular utilizados foram o DNA de Lambda clivado com HindIII, e um "ladder" de 100 pb (GIBCO-BRL). A análise da variabilidade genética foi realizada pelo agrupamento das linhagens segundo os princípios adotados em taxonomia numérica. Foi utilizado o coeficiente de similaridade Jaccard, que permite calcular similaridades com base em variáveis binárias (0 para ausência e 1 para presença de banda). As bandas foram consideradas como variáveis enquanto as linhagens como unidades. O coeficiente foi calculado segundo a fórmula $J=M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis, menos concordâncias negativas (Sneath & Sokal, 1973).

Desta forma, o coeficiente de similaridade Jaccard (J) leva em conta apenas as discordâncias e as concordâncias positivas, quanto a presença ou ausência de

bandas, desconsiderando as concordâncias negativas. Quanto maior a semelhança entre duas linhagens, maior é o valor do coeficiente de similaridade. As unidades foram agrupadas através do método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average), que é um modelo de agrupamento hierárquico, e permite a construção de dendrogramas (Sneath & Sokal, 1973). Matrizes e dendrogramas foram elaborados com auxílio do programa NTSYS (Numerical taxonomy system of multivariate programs) (Rohlf, 1988) e Winboot (Yap & Nelson, 1996).

Para verificar a consistência dos agrupamentos verificados, foi realizada uma análise “bootstrap” segundo descrito por Felsenstein (1985) utilizando o software Winboot (Yap & Nelson, 1996). Foram realizadas duas mil reamostragem com reposição dos dados dos marcadores. Foram considerados consistentes os agrupamentos que apresentaram P maior ou igual a 95%, sendo P a frequência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições “bootstrap”.

3.10. Discriminação de Isolados Patogênicos

3.10.1. Obtenção da banda

Após seleção de bandas de RAPD específicas para linhagens patogênicas, uma nova reação de RAPD foi realizada utilizando o DNA do isolado PC13 e o “primer” OPX14. A eletroforese foi realizada utilizando tampão TAE 1X (item 3.2.39) e a banda foi purificada utilizando o Kit “Sephaglas Band Prep” da Pharmacia Biotech.

O DNA da banda purificada (p373) foi utilizado, em conjunto com o “primer” OPX14, para uma reação de reamplificação usando as mesmas condições das reações de RAPD (item 3.9.2).

3.10.2. Clonagem do Fragmento p373

3.10.2.1. Ligação

Após a reamplificação da banda, o DNA resultante foi precipitado com Etanol Absoluto (2,5 volumes), lavado com Etanol 70%, secado e ressuspendido em

volume apropriado de Água Milli-Q. Aproximadamente 200 ng do DNA correspondente à banda foram utilizados para a ligação utilizando o Kit da PROMEGA “pGEM-T Easy Vector Systems” (Apêndice 2). A reação de ligação foi mantida a 14°C por 16 horas.

3.10.2.2. Obtenção de células bacterianas competentes para eletroporação:

100 ml de LB (item 3.1.6) foram inoculados com 1 ml de uma cultura de *E. coli* DH5 α F' crescida por 12 horas a 37°C, e mantidos a 37°C com forte agitação por aproximadamente 2 horas. A cada 20 minutos realizou-se leitura em espectrofotômetro com absorbância a 550 nm, até atingir uma OD igual a 0,4 a 0,45. A cultura foi então mantida em gelo por 5 minutos e centrifugada a 5.000 rpm a 4°C por 5 minutos. As células foram ressuspensas em água gelada, centrifugadas nas condições descritas acima e este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. O precipitado final de células foi ressuspendido em 140 μ l de água gelada e 7% de dimetilsulfoxido (DMSO), aliquotadas em 40 μ l e mantidas a -70°C.

3.10.2.3. Transformação bacteriana por eletroporação

5 μ l da reação de ligação (item 3.10.2.1) foram adicionados a 40 μ l de células competentes de *E. coli* DH5 α F' (item 3.10.2.2) e a solução transferida para cubetas de 0,2mm para eletroporação. Foi utilizado o aparelho Gene Pulser II da Bio Rad, voltagem de 2,5 KV por 1,26 mSeg. e capacitância de 25 μ F. Imediatamente após a eletroporação as células foram inoculadas em Meio LB líquido (item 3.1.6) e mantidas a 37°C por 1 hora. Após este período, as células foram inoculadas em placas contendo meio LB, 100 μ g/ml de ampicilina, 40 μ l de X-Gal (item 3.2.48) e 40 μ l de IPTG (item.3.2.18), e mantidas a 37°C por 24 horas.

As colônias brancas recombinantes foram isoladas para purificação e análise dos plasmídios.

3.10.2.4. Purificação do plasmídio por Lise Alcalina

5 ml de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/ml) foram inoculados com uma colônia bacteriana isolada (item 3.10.2.3) e incubados por 12 horas a 37°C sob forte agitação (200 rpm). As células foram sedimentadas por centrifugação a 5.000 rpm por 2 minutos, e ressuspensas com 100 µl da solução A (item 3.2.30). Após, acrescentou-se 200 µl da solução B (item 3.2.31), misturou-se por inversão e a solução foi mantida em gelo por 5 minutos. Adicionou-se a esta solução, 150 µl da solução C (item 3.2.32), misturou-se por inversão diversas vezes e centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado 50 µg de RNase (item 3.2.24) e incubado a 37°C por 1 hora. Após realizou-se um tratamento com fenol-clorofórmio, e as fases foram separadas por centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e acrescentou-se 2 volumes de Etanol. Após 5 minutos no gelo, precipitou-se o plasmídio por centrifugação a 14.000 por 5 minutos. O precipitado foi lavado com Etanol 70%, deixado para secar e ressuspendido em 20 µl de TE (item 3.2.43).

A fim de confirmar a presença do inserto no plasmídio purificado, uma reação de amplificação foi realizada utilizando o plasmídio e o primer OPX14 com o qual o fragmento original foi gerado.

4.10.3. Seqüenciamento

O seqüenciamento do fragmento foi realizado utilizando o Kit "T7 Sequencing" da Pharmacia Biotech, segundo o protocolo de seqüenciamento de DNA fita dupla com o método de Sanger et al. (1977).

2 µg de DNA fita dupla (32 µl) foram desnaturados utilizando 8 µl de NaOH 2 M e 10 µl de água Milli-Q, e a solução incubada a 37°C por 30 minutos. Após, acrescentou-se 7 µl de Acetato de Sódio 3 M (item 3.2.2) e 120 µl de Etanol Absoluto e incubou-se em gelo por 15 minutos para precipitação do DNA. A solução foi centrifugada, o precipitado de DNA lavado com Etanol 70%, deixado para secar e

ressuspendido em 10 µl de água destilada. Os 10 µl do DNA molde foram misturados com 5 µM de “primer” universal (2 µl) e 2 µl do tampão de anelamento. A solução foi incubada a 65°C por 5 minutos, e em seguida a 37°C por 20 minutos, e 10 minutos a temperatura ambiente para promover o anelamento.

Para a reação de marcação, adicionou-se a esta solução, 3 µl de [α -³⁵S]dATP 10 mCi/ml, 1 µl de “Labeling mix” e 2 µl da enzima T7 DNA Polimerase diluída (1,5U/µl) e incubou-se a solução a temperatura ambiente por 5 minutos. Após, 4,5 µl desta solução foram distribuídos em 4 tubos de microcentrífuga contendo as soluções de terminação de cadeia A, C, G e T respectivamente, e a solução incubada a 37°C por 5 minutos. Adicionou-se 5 µl da solução de término em cada tubo de microcentrífuga, e alíquotas de 3 µl de cada reação foram desnaturadas a 80°C por 2 minutos, mergulhadas imediatamente em gelo e aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante 6% (item 3.2.16), para a resolução da sequência.

Após a corrida de eletroforese, o gel foi lavado por 45 minutos em uma solução de Metanol 10% e ácido acético 10%, secado por 40 minutos em papel de filtro sob vácuo e introduzido em cassete para autoradiografia, mantendo o filme de raio-X (Kodak XAR-2) em contato direto com o gel, por 48 horas. A sequência de bases foi determinada a partir do padrão de bandas visualizado no filme. A sequência foi analisada pelo programa GeneRunner 3.03 (1994).

3.10.4. “Southern Blotting” e Hibridação

3.10.4.1. “Southern Blotting”

10 µg de DNA genômico de 18 isolados de *Guignardia* sp, sendo 6 patogênicos (PCP6, PCP7, PCP8, PC2, PC23 e PCFM), 9 endofíticos (ECPR3, ECPR10, ECPR16, ECRP1, ECRP5, ECRP6, EC131, EC171, ECPOA8), 1 endofítico de Guaraná (EG1Z) e 2 patogênicos de Goiaba (PG1506 e PG1515) foram clivados com 40 U da enzima de restrição EcoRI por 5 horas a 37°C e os fragmentos resultantes foram separados em gel de agarose 1% em TAE 1x (item 3.2.39), com 0,7 V/cm por 13 horas.

Em seguida o gel foi tratado com HCl 0,2N por 10 minutos, lavado em água Milli-Q e deixado em solução desnaturante (item 3.2.34) por 45 minutos. Após mais uma lavagem com água Milli-Q, o gel foi deixado por 30 minutos em solução neutralizante (item 3.2.35) e novamente lavado em água Milli-Q. Após nova imersão em solução neutralizante (item 3.2.34) por 30 minutos o gel foi lavado em água Milli-Q, e colocado em suporte em contato com uma membrana de nylon (Bio Rad Zeta-Probe Blotting Membranes) e submetido a transferência por capilaridade, segundo Southern (1975), utilizando tampão de transferência SSC 20x (item 3.2.37), como descrito por Sambrook et al. (1989).

Após 18 horas de transferência, a membrana foi lavada em SSC 5x, colocada para secar em papel de filtro por 30 minutos e em deixada a 80°C por 2 horas, a fim de fixar o DNA na mesma.

3.10.4.2. Marcação da sonda

50 ng do DNA do fragmento obtido no item 3.10.1 foram marcados com CTP³² pelo método de “Random Primer” utilizando o Kit “Oligo Primer” da Pharmacia Biotech. A 34 µl do fragmento foram acrescentados 5 µl de CTP³², e 10 µl de “labeling mix” (tampão, primer, dATP, dGTP, dTTP) e 1 U da enzima DNA polimerase I (fragmento Klenow). A solução foi incubada a 37°C por 1 hora e aquecida a 94°C por 5 minutos no momento do uso, para desnaturação da sonda.

3.10.4.3. Hibridação

A membrana contendo o DNA (item 3.10.4.1) foi transferida para frascos de hibridação e foi incubada a 55°C por 30 minutos, em solução de hibridação (Na₂HPO₄ 0,5 M pH 7,2 e SDS 7%), para pré-hibridação da membrana. Após este período, a solução de hibridação foi substituída e recebeu a adição da sonda marcada e desnaturada (item 3.10.4.2) por 16 horas. A membrana foi então lavada em solução de Na₂HPO₄ 40mM pH 7,2 e SDS 5% a 65°C por 30 minutos e mais 30 minutos em

solução de Na_2HPO_4 40mM pH 7,2 e SDS 1% a 65°C. Em seguida a membrana foi introduzida em cassete para autoradiografia com filme de Raio-X (KODAK X-OMAT XAR-5) e incubada a 4°C por 7 dias.

3.10.5. PCR

A partir da sequência obtida no item 4.3.10, foi desenhado e sintetizado um par de “primers” para amplificação de uma banda exclusiva de isolados patogênicos de *G. citricarpa*, o GCP1 (5' AAGTGTGAGTGTCGAAGGTGG3') e o GCP2 (5'GACGACTCGCTTTTCTACGGC 3'). As concentrações finais de cada reagente para a reação de PCR foram: 50 ng de DNA genômico dos isolados fúngicos, 3 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 μM de cada “primer” e 1,5 U de Taq DNA Polimerase, em um volume final de 25 μl . As condições de amplificação utilizadas foram: uma desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos que consistem de 1 minuto de desnaturação (92°C), 1 minuto de anelamento (67°C) e 1 minuto de extensão (72°C). Os controles positivos utilizados foram: a) na mesma reação: 10 ng do DNA do plasmídeo pGEM-T contendo o inserto de 373 pb; b) em outra reação realizada nas mesmas condições e ao mesmo tempo: amplificação com os “primers” hph1 e hph2.

3.11. Cariótipo Eletroforético

Como objetivou-se a separação de cromossomos intactos, as técnicas rotineiras para a obtenção de DNA genômico não puderam ser utilizadas neste caso. Para a obtenção de cromossomos intactos, foram utilizados protoplastos (fungo filamentosos) ou células (leveduras para padrão de peso molecular), incluídos em pequenos géis de agarose (“plugs”). As etapas foram as seguintes:

3.11.1. Obtenção de Protoplastos (Silveira & Azevedo, 1987, com modificações):

Uma solução de esporos obtido como no item 4.8. foi inoculada em frascos contendo meio MEASP (item 3.1.4) líquido acrescido de 5 ppm de Fongorene, e incubada por 30 horas a 28°C sob agitação (150 rpm). O micélio foi filtrado em filtro de Büchner com auxílio de bomba de vácuo, lavado com Manitol 0,6M (item 3.2.19) e ressuscitado em 100 ml de Manitol 0,6M contendo 100 mg de Novozyme 234. A solução foi incubada por aproximadamente 3 horas a 28°C sob leve agitação. Após a obtenção dos protoplastos, a solução foi filtrada em seringa contendo lã de vidro e centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos. Os protoplastos foram ressuscitados em 5 ml de MgSO₄ 1,2 M (item 3.2.21) e acrescentou-se lentamente 5 ml de Sorbitol 0,6 M (item 3.2.36) sem deixar misturar as fases. Centrifugou-se por 10 minutos a 4.000 rpm e recuperou-se a fase intermediária. Completou-se o volume com Manitol 0,6M e centrifugou-se por 5 minutos a 4.000 rpm. Esta lavagem foi repetida por 3 vezes e os protoplastos resultantes foram ressuscitados em Manitol 0,6M para obter 2×10^8 protoplastos/ml.

3.11.2. Preparação de células de *Saccharomyces cerevisiae*

50 ml de meio YEPD líquido (item 3.1.5) foram inoculados com a levedura *S. cerevisiae* e incubados a 30°C sob agitação (150 rpm) por 15 horas. Após centrifugação a 4.000 rpm por 5 minutos, lavou-se o "pellet" de células 3 vezes com 10 ml de EDTA 50mM pH 8,0 (item 3.2.8) e este foi ressuscitado em EDTA 50 mM pH 8,0 para obter-se $2,5 \times 10^9$ células/ml.

3.11.3. Preparação dos "Plugs"

Após a obtenção dos protoplastos ou células, estes foram aquecidos a 42°C e misturados com agarose "Low Gelling Temperature" (LGT) 1,4% (item 3.2.15), colocados em moldes, e após a solidificação dos "plugs", estes foram tratados com tampão de lise NDS (item 3.2.23), como descrito por Brody & Carbon (1989). Os

"plugs" lavados três vezes em solução de EDTA 50 mM (item 3.2.8), e foram armazenados nesta solução a 4°C.

3.11.4. Eletroforese em Campo Pulsado

A eletroforese em campo pulsado foi realizada em CHEF (CHEF DR II, Bio Rad), que tem disposição hexagonal dos eletrodos e ângulo fixo de 120°. Dois protocolos foram estabelecidos para separação dos cromossomos de 1 a 3 Mb e um para detecção de minicromossomos.

3.11.4.1. Protocolo 1.

a. Preparação do gel com agarose 0,8% (item 3.2.13) em tampão TAE 1 x (item 3.2.39);

b. Inserção dos "plugs" nas canaletas e vedação com agarose derretida;

c. Eletroforese nas seguintes condições:

Temperatura de corrida: 15°C

Voltagem: 100 volts

Pulsos: Rampa de 150 a 600 segundos por 75 horas

Pulso de 2.200 segundos a 48 V por 24 horas

d. Coloração do gel com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 30 minutos e lavagem em água destilada por 40 minutos. O gel será observado e fotografado em transiluminador sob luz ultravioleta.

3.11.4.2. Protocolo 2:

Protocolo 1 sem o pulso final de 2.200 segundos a 48 V por 24 horas.

3.11.4.3. Protocolo 3:

a. Preparação do gel com agarose 1% (item 3.2.14) em tampão TBE 0,5 x (item 3.2.40);

b. Inserção dos "plugs" nas canaletas e vedação com agarose derretida;

c. Eletroforese nas seguintes condições:

Temperatura de corrida: 14°C

Voltagem: 100 volts

Pulsos: 60 segundos por 15 horas

d. Coloração do gel com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 30 minutos e lavagem em água destilada por 40 minutos. O gel será observado e fotografado em transiluminador sob luz ultravioleta.

O protocolo 1 foi utilizado para separação dos cromossomos dos isolados EC86, EC216 e PC4. O protocolo 2 foi utilizado para separação dos cromossomos do isolado EC86, e o protocolo 3 foi utilizado para verificação quanto a presença de minicromossomos nos isolados PC1, PC23, PCP6, PCFM, PC4, PC2, PC4, PC5, PC9, PC97013, PC97014, ECPR3, ECOL23, EC86, EC216 e EC320.

Para estimativa do peso molecular dos cromossomos bem como do tamanho do genoma de *G. citricarpa*, foram utilizados como padrão *S. cerevisiae* e *A. nidulans* (MSE), sendo utilizado o programa Kodak 1D.

3.12. Caracterização Morfo-fisiológica

Os parâmetros avaliados foram: 1) taxa de crescimento em meio MC sólido; 2) tipo de esporulação *in vitro* e 3) tamanho de estruturas de reprodução *in vitro*, objetivando-se a comparação entre os isolados de *Guignardia* spp; 4) Curvas de germinação *in vitro* de 3 isolados, a fim de verificar as condições ideais de germinação;

5) Microscopia ótica da germinação *in vivo* dos conídios de *G. citricarpa*, 6) Microscopia Eletrônica de Varredura da infecção fúngica em folhas axênicas de citros.

3.12.1. Curva de Crescimento

Em placas de MC (item 3.1.2) foram inoculados fragmentos circulares de 0,7 cm de diâmetro de colônias de vários isolados de *Guignardia* spp. Esses fragmentos foram colocados no centro de placas de mesmo diâmetro (8,5cm) e as placas colocadas em estufa a 28°C, sendo feitas medições do diâmetro das colônias a intervalos de 48 horas até que as colônias completassem 24 dias de crescimento. Foram feitas 3 repetições em parcelas subdividas, dos isolados PC13, EC131, EC145, ECN22, ECOI23, ECAF7.5 LP, PG1515, PC45, ECPR3, ECPR6, ECPR10, PC97013, PC97014, EG3Z e ECALG 1-16.

Os valores obtidos foram submetidos a análise de variância pelo método de parcelas subdividas em primeira instância, e posteriormente os valores obtidos com 10 e 12 dias de crescimento, foram utilizados para análises de variâncias individuais e testes de média do tipo Tukey.

3.12.2. Estudo do Tipo e Tamanho das Estruturas de Reprodução

As placas utilizadas no item 3.12.1, foram também utilizadas para observação do tipo de esporulação em microscopia ótica, utilizando o corante a base de azul de anilina (item 3.2.33), no período de 12 a 45 dias de crescimento. Os isolados que esporularam tiveram suas estruturas de reprodução estimadas em microscópio ótico, utilizando-se objetiva específica.

3.12.3. Curva de Germinação *in vitro*

A fim de verificar se há variação na taxa de germinação dos conídios, em função dos isolados, tempo de crescimento e diluição semeada, soluções de 1×10^6 esporos/ml foram obtidas conforme metodologia descrita no item 3.8. Foram feitas diluições seriadas dessas soluções e semeados 100µl das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em placas de MC (item 3.1.2), espalhando-se em seguida com auxílio de alça de

Drygalsky. As placas foram incubadas a 28°C por 4 dias e estimada a porcentagem de germinação.

Foi analisada a taxa de germinação de esporos dos isolados EC145, ECPR8 e PC13. Colônias dos isolados PC13 e ECPR8 com 2, 3 e 4 semanas foram analisadas, enquanto o isolado EC145 foi analisado apenas com colônias de 4 semanas de crescimento em meio de cultura. Na análise dos isolados PC13 e ECPR8 com 4 semanas de crescimento, os esporos antes de serem diluídos e semeados, sofreram 3 lavagens com água destilada autoclavada para remoção de pigmentos e microconídios.

3.12.4. Germinação *in vivo*

Foi verificado também a germinação dos esporos do isolado EC145 na superfície do hospedeiro. A inoculação foi realizada com uma gota da suspensão de conídios (aproximadamente 1×10^6 conídios/ml de Tween 80 0,1%) obtida conforme metodologia descrita no item 3.8, na superfície de folhas axênicas de citros. As plantas axênicas foram produzidas pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas, e micropropagadas no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná. Após a inoculação, as folhas foram conservadas em placas de Petri, sobre papel de filtro umedecido, e incubados a 28°C por 72 horas.

Após este período, as folhas foram observadas em microscópio ótico sendo as lâminas preparadas segundo a metodologia descrita por Bruzzese & Hasan (1983). As folhas foram cortadas em fragmentos de 3 centímetros e imersas na solução clareadora (item 3.2.33) (2ml/cm² de tecido), onde permaneceram por 48 horas a temperatura ambiente. Após, os fragmentos foram submetidos a uma solução concentrada de hidrato de chloral (item 3.2.17) por 12 a 24 horas. Os fragmentos foram então lavados rapidamente em água destilada, montados em lâminas para observação e fotografados.

3.12.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os fragmentos foliares foram inoculados conforme descrito no item 3.12.4 e após 10 dias de incubação a 28°C, foram analisados em MEV sendo seguida a metodologia descrita por Viret & Petrini (1994). A preparação das amostras consistiu basicamente em seis etapas: a) Fixação do material em glutaraldeído; b) lavagem; c) pós-fixação em tetróxido de ósmio; d) secagem ao ponto crítico; e) montagem em suporte; f) metalização com ouro.

A metade dos fragmentos inoculados foram ensaiados para a verificação da existência de hifas crescendo no interior dos fragmentos foliares, segundo metodologia descrita por Glienke et al. (1996). Para tanto, após 10 dias de incubação, os fragmentos foram fixados em FAA (item 3.2.10) por 48 horas, sendo então preparados para análise em MEV. Este preparo consistiu resumidamente de uma hidratação das amostras, tratamento com Proteinase K (3 mg/ml) por 18 horas a 55°C, e desidratação das mesmas. As amostras foram fatiadas em finos cortes transversais, secadas ao ponto crítico (Viret & Petrini, 1994) e metalizadas com ouro. A Proteinase K foi utilizada para a remoção do citoplasma foliar, propiciando a exposição das hifas fúngicas.

3.13. Extração e Purificação de Exopolissacarídios:

Para verificar-se a produção de exopolissacarídios por isolados de *G. citricarpa*, foram utilizados 3 isolados: EC145, ECPR8 e PC13. Inoculou-se 50 ml de uma solução de conídios 1×10^5 , obtidos conforme metodologia descrita no item 3.8, em meio Glicose (item 3.1.8.) e meio Sacarose (item 3.1.9.), acrescidos de tetraciclina (100µg/ml). Incubou-se a 30°C durante cinco dias sob agitação (150 rpm). Além da variação na fonte de carbono, variou-se também o pH dos meios de cultura. Foram utilizados valores de pH 3,5 a 9,5, em intervalos de uma unidade.

Após o crescimento dos isolados, os meios com micélio foram filtrados em funil de Büchner e Kitasato, com o auxílio de uma bomba de vácuo, e em seguida o filtrado limpo (após observação em microscópio para descartar a presença de hifas) foi precipitado em 3 volumes de Etanol Absoluto gelado. Após precipitação dos exopolissacarídios, foi precedida de decantação a frio e centrifugação. O precipitado foi

ressuspendido em água destilada e dializado por 48 horas contra essa mesma solução. Após liofilização do material, este foi submetido a hidrólise ácida seguida de análise em Cromatografia Gasosa. Foi ainda realizada Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética do carbono 13.

3.14. Obtenção de Mutantes

Inicialmente um isolado endofítico de *G. citricarpa* (EC145) foi utilizado para o isolamento de mutantes auxotróficos. Para tanto foi empregada a luz ultravioleta como agente mutagênico (comprimento de onda de 250 nm). A solução de esporos obtida segundo a metodologia descrita no item 3.8, foi lavada duas vezes em água destilada para remoção dos pigmentos (verde escuro) presentes na solução. Aproximadamente 1×10^6 esporos foram expostos a luz ultravioleta empregando-se tempos de exposição de 0 (controle), 30 segundos, 1, 2, 4, 8, 12, 16 e 20 minutos, a fim de obter-se uma curva de sobrevivência. O tempo de exposição escolhido foi aquele que conferiu em torno de 5% de sobrevivência. Após a exposição ao tempo apropriado foi utilizado uma técnica de enriquecimento de auxotróficos (Fincham et al., 1979), onde as células irradiadas foram inoculadas em 100 ml de meio mínimo MM (item 3.1.1) líquido por 24 horas, filtradas em seringa com lã de vidro e a solução resultante concentrada por centrifugação. Os conídios foram ressuspendidos em solução salina (item 3.2.25) para obter-se uma concentração de 1×10^4 / ml e 100 µl foram inoculados em cada placa de meio completo sólido (MC) (item 3.1.2) com auxílio de alça de Drygalsky.

As colônias que cresceram em MC foram repicadas para placas de meio MM de 26 pontos para que os mutantes fossem purificados, sendo o controle, o mesmo isolado não exposto a luz UV. Os inóculos que não cresceram em MM foram passados para MC e deixados para crescer a 28°C por 25 dias. Tais mutantes foram então purificados por colônia monospórica e cada colônia resultante repicada em MM. Novamente, os inóculos que não cresceram foram passados para MC, sendo estes os mutantes utilizados para a caracterização.

A caracterização dos mutantes auxotróficos foi feita adicionando-se ao MM contendo esporos dos possíveis mutantes, gotas de fontes de vitaminas (item 3.2.47), aminoácidos (item 3.2.4) e componentes dos ácidos nucleicos (item 3.2.3). De acordo com o crescimento ou não nestes meios, os mutantes foram caracterizados para sua deficiência nutricional (Fincham et al., 1979).

A caracterização do mutante albino foi realizada de duas formas: inoculando-o em placas de MC acrescidas de extrato da linhagem selvagem (pigmentada); e inoculando-o em placas de MC juntamente com a linhagem selvagem.

3.15. Transformação Genética

3.15.1. Seleção do Marcador

Os isolados EC145, ECPR3, ECPR8, PC13, PC18 e PC97013 foram inicialmente ensaiados quanto a resistência a higromicina B, para verificar a validade do marcador a ser utilizado para o desenvolvimento do sistema de transformação. Assim, uma suspensão de esporos de cada isolado, obtida segundo a metodologia descrita no item 3.8, foi semeada em meio MC contendo higromicina B nas concentrações de 0 (controle), 100, 200 e 300 µg/ml. O crescimento foi feito a 28°C por 7 dias.

3.15.2. Obtenção do Plasmídio

A amplificação do vetor foi realizada segundo a metodologia descrita por Sambrook et al. (1989), transformando-se a linhagem de *E. coli* DH10B por cloreto de cálcio e choque térmico.

3.15.2.1. Obtenção de Células Bacterianas Competentes para Transformação por CaCl₂:

100 ml de LB (item 3.1.6) foram inoculados com 1 ml de uma cultura de *E. coli* DH10B crescida por 12 horas a 37°C, e mantidos a 37°C com forte agitação por

aproximadamente 2 horas. A cada 20 minutos realizou-se leitura em espectrofotômetro com absorbância a 550 nm, até atingir uma OD igual a 0,4 a 0,45. A cultura foi então mantida em gelo por 5 minutos e centrifugada a 5.000 rpm a 4°C por 5 minutos. As células foram então ressuspensas em 50 ml da Solução SATB (item 3.2.28) gelada e incubada em gelo por 15 minutos. Após sedimentação das células como descrito acima, o precipitado foi ressuspensado em 7 ml da Solução SBTB (item 3.2.29). As células foram então aliquotadas em 200 µl e mantidas a -70°C.

3.15.2.2. Transformação de *E. coli*

Acrescentou-se 5 ng de DNA do plasmídeo pCSN43 em 200 µl de células competentes de DH10B (item 3.15.2.1) descongeladas em gelo, e incubou-se em gelo por 10 minutos. As células sofreram então um choque térmico a 47°C por 1 minuto e 45 segundos, e a elas acrescentou-se 1ml de meio LB líquido e incubou-se a 37°C. Após 30 minutos os 900 µl restantes foram semeados em meio LB acrescido de 250 µg/ml de Ampicilina, e todas as placas foram incubadas a 37°C por 12 horas. O controle negativo foi obtido com células não transformadas em meio LB acrescido de 250 µg/ml de Ampicilina. Uma colônia transformante foi então repicada em meio LB líquido acrescido de ampicilina, e estocada em alíquotas de 100 µl a -20°C.

3.15.2.3. Purificação do plasmídeo pCSN43

5 ml de meio LB com 250 µg/ml de ampicilina foram inoculados com 100 µl de *E. coli* DH10B transformada (item 3.15.2.2) e incubados por 12 horas a 37°C sob agitação. O plasmídeo foi extraído e purificado utilizando-se o Kit “Concert” da GIBCO BRL

3.15.3. Transformação de protoplastos

Inicialmente, foi ensaiado o sistema de transformação para protoplastos dos isolados ECPR3 e PC18, obtidos segundo a metodologia descrita no item 3.11.1. Os protoplastos foram então ressuspensos em 1 ml da solução SBTF (item 3.2.27), obtendo-se 1×10^7 protoplastos/ml. 100 μ l desta solução foram submetidos a transformação com 4 μ g de DNA do plasmídeo pCSN43. Acrescentou-se 50 μ l da solução SATF (item 3.2.26) e incubou-se em gelo por 15 minutos e após, acrescentou-se 1 ml da solução SBTF e incubou-se a temperatura ambiente por 15 minutos. 200 μ l desta solução resultante foram inoculados em 3 ml de meio MCT (item 3.1.3) a 45°C e distribuídos em placas contendo meio MCT pré-aquecido a 42°C. As placas foram incubadas a 28°C por 22 horas, e então recobertas com 20 ml de MC (item 3.1.2) contendo 200 μ g/ml de higromicina B.

3.15.4. Transformação de Células Intactas com Auxílio de Acetato de Lítio

Foi obtida uma solução de esporos (1×10^7 conídios) do isolado ECPR8 segundo a metodologia descrita no item 3.8, que foram então lavados 2 vezes em água destilada, ressuspensos em 10 ml de água destilada e colocados em frasco de poliestireno para cultura de células e incubados a 28°C, na posição horizontal e sem agitação por 2 horas e 30 minutos. Os conídios germinados foram então destacados do fundo do frasco com auxílio de pequenos magnetos esterilizados adicionados a solução, movimentados por meio de um pequeno ímã. A solução foi transferida para tubos de centrifuga de 15 ml e centrifugada por 5 minutos a 5.000 rpm. Os esporos foram lavados em 10 ml de TE (item 3.2.43) e ressuspensos em 1 ml de Acetato de Lítio (item 3.2.1) (para dar uma solução $1,0 \times 10^7$ conídios/ml) e incubados por 1 hora a 28°C sob agitação. A esta solução adicionou-se 15 μ g do plasmídeo pCSN43 e incubou-se por mais 30 minutos a 28°C sob agitação. Adicionou-se então 4 ml de uma solução de PEG 4000 (40% na solução 3.2.1), incubou-se a 28°C por 30 minutos sob agitação e lavou-se os conídios 2 vezes em água destilada autoclavada. Os conídios germinados foram

ressuspensos em 10 ml de água destilada autoclavada e 1 ml (aproximadamente 1×10^5 conídios) foram inoculados “pour plate” em placas contendo 15 ml de meio MC (item 3.1.2) e incubados a 28°C por 17 horas. Após este período de crescimento, as placas foram cobertas com 15 ml de meio MC contendo higromicina B (200 µg/ml) e incubadas a 28°C por até 15 dias.

3.15.5. Estabilidade Mitótica dos Transformantes

Para testar a estabilidade mitótica dos transformantes de *G. citricarpa*, pequena porção de micélio das colônias que cresceram no meio seletivo foram isoladas e repicadas alternadamente 5 vezes em meio de cultura com e sem higromicina B

3.15.6. Análise dos Transformantes via PCR

Os prováveis transformantes de *G. citricarpa* foram testados quanto a presença do gene *hph*, por amplificação via PCR, de um fragmento de 462 pb, utilizando os “primers” *hph1* (5'-AGCGTCTCCGACCTGATG-3') e *hph2* (5'-CGACGGACGCACTGACGG-3') (Dantas-Barbosa et al., 1998). O protocolo de amplificação utilizado foi, uma desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação (92°C), 1 minuto de anelamento (67°C) e 1 minuto de extensão (72°C).

Para a reação de amplificação da banda dos prováveis transformantes, 50 ng de DNA genômico foi utilizado. O controle negativo consistiu desta mesma quantidade de DNA do isolado selvagem não transformado, e para o controle positivo foram utilizados 10 ng do DNA do plasmídeo pCSN43.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamentos de fungos endofíticos

Setenta colônias de *G. citricarpa* foram isoladas de folhas aparentemente saudáveis de citros no período de Julho de 1995 a Dezembro de 1997. Destas, 59 foram selecionadas para as análises apresentadas neste trabalho (Observação 2 da Tabela 1, Item 3.5.5).

4.2. Extração de DNA

O DNA obtido diretamente do micélio crescido em meio sólido e liofilizado posteriormente, apresentou pelo menos duas vantagens em relação ao obtido pela metodologia convencional onde micélio crescido em meio de cultura líquido foi empregado. A primeira, diz respeito ao menor tempo necessário entre a purificação do fungo isolado e a obtenção do DNA (Tabela 2). Enquanto pelo método tradicional eram necessários 32 dias, pelo método modificado foram gastos em média 3 dias, reduzindo em quase 1 mês este processo.

Tabela 2. Tempo necessário entre a purificação do fungo e a obtenção do DNA, utilizando-se o método convencional (micélio crescido em meio de cultura líquido) e o modificado (micélio crescido em meio de cultura sólido).

ETAPAS	CONVENCIONAL	MODIFICADO
Obtenção de esporos	28 dias	----
Crescimento do micélio	4 dias	3 dias
Total	32 dias	3 dias

A segunda vantagem é a qualidade do DNA obtido, uma vez que pelo método modificado, este apresentou-se mais puro e conseqüentemente mais solúvel. Este resultado pode ser conseqüência da diminuição na produção de polissacarídeos pelo fungo, quando as modificações foram introduzidas, uma vez que *G. citricarpa* apresenta produção de exopolissacarídeos quando em meio de cultura líquido, como será visto no item 4.6.5. Desta forma, o método modificado apresentou-se superior ao convencional e pode ser aplicado em qualquer fungo com as mesmas características.

4.3. RAPD

Com o objetivo de comparar geneticamente isolados de populações patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp, estudou-se a variabilidade por meio de marcadores de RAPD de 103 isolados de diversas regiões e hospedeiros (Tabela 1). Utilizando-se 6 “primers”, obteve-se 143 bandas que podem ser observadas nas Figuras 1 a 6. A análise dos dados gerou pelo menos 3 grupos distintos com menos de 50% de similaridade genética (Anexo A e Figura 7), sendo assim formados: 1) 26 isolados de *G. citricarpa* patogênicos de citros e a linhagem referência de *G. citricarpa* (CBS 111.20); 2) 10 isolados de *G. citricarpa* endofíticos de citros de Rio Negro/PR; 3) 33 isolados endofíticos de citros do Brasil (*G. citricarpa*), os 4 isolados de *G. citricarpa* endofíticos de citros da Argentina, os 4 isolados endofíticos de guaraná (*Guignardia* sp), os 9 isolados patogênicos de goiabeira (*G. psidii*), o isolado endofítico de eucalipto (*Guignardia* sp) e 10 isolados de *G. citricarpa* patogênicos de citros, num total de 98 isolados. Os 5 isolados de *G. citricarpa* restantes estão distribuídos em praticamente mais 4 grupos: 4) constituído por um isolado patogênico, o PC19; 5) constituído por um isolado endofítico, o ECOL23 e pelo isolado patogênico PC97010; 6) Isolado endofítico EC131; 7) Isolado endofítico EC145, sendo que estes 4 grupos restantes assemelham-se mais ao grupo 3, enquanto o grupo 2 é mais semelhante geneticamente ao grupo 1.

A Figura 7 apresenta os valores encontrados pela análise de “bootstrap” para os principais agrupamentos e aqueles onde o P foi superior a 90%. Estes valores estão localizados a esquerda dos agrupamentos no dendrograma e foi obtido utilizando o software Winboot (Yap & Nelson, 1996), conforme Anexo B.

Figura 1: Padrão eletroforético dos isolados de *Guignardia* spp, obtido com o "primer" OPX8. M: marcador de peso molecular, DNA λ clivado com HindIII. B: Controle sem DNA.

Figura 3: Padrão eletroforético dos isolados de *Guignardia* spp, obtido com o "primer" OPX 12. M: marcador de peso molecular, DNA "Ladder" de 100 pb. B: Controle sem DNA.

Figura 4: Padrão eletroforético dos isolados de *Guignardia* spp, obtido com o "primer" OPX14. M: marcador de peso molecular, DNA "Ladder" de 100 pb. B: Controle sem DNA.

Figura 5: Padrão eletroforético dos isolados de *Guignardia* spp. com o "primer" OPX17. M: marcador de peso molecular, DNA λ clivado com HindIII. B: Controle sem DNA.

Figura 6: Padrão eletroforético dos isolados de *Guignardia* spp. com o "primer" OPX19. Ladder: marcador de peso molecular, DNA "Ladder" de 100 pb.

Figura 7: Dendrograma obtido com os dados de similaridade genética dos 103 isolados de *Guignardia* spp.

Segundo a análise “bootstrap” sugerida por Felsenstein (1985), apenas os agrupamentos com P maior ou igual a 95% podem ser considerados como reais, ou seja, seus componentes devem realmente estar agrupados. Agrupamentos cujo P é menor que 95% podem existir realmente ou terem sua origem em desvios amostrais. Observando a Figura 7 e o Anexo B, e utilizando este conceito restrito, observa-se que os principais agrupamentos são consistentes, porém os subgrupos dentro destes grandes grupos não são totalmente confiáveis, uma vez que os valores apresentados pela análise de “bootstrap” variaram de 100 a 0,5%.

Analisando os 3 principais agrupamentos (1, 2 e 3) obtidos (Figura 7), 4 observações são evidentes. Primeiro, percebe-se nítida distinção entre a maioria dos isolados patogênicos de *G. citricarpa* e os demais isolados. Segundo, a maioria dos isolados endofíticos de *G. citricarpa* agrupam-se com os isolados de *Guignardia* spp de outros hospedeiros. Terceiro, 10 isolados obtidos de lesão de MPC agruparam-se com os endofíticos de *G. citricarpa*. E finalmente, dos 12 isolados endofíticos de *G. citricarpa* obtidos de Rio Negro (PR), 10 deles (aqueles obtidos de folhas sadias de limão), agrupam-se em uma terceira categoria, sendo mais similares geneticamente aos isolados patogênicos de *G. citricarpa* do que aos demais isolados endofíticos. Por outro lado, os dois isolados obtidos de folhas sadias de laranja em Rio Negro (PR), agrupam-se com os demais isolados endofíticos de citros. Isto mostra claramente, que com exceção dos isolados de Rio Negro (PR), os isolados de *G. citricarpa*, *G. psidii* e *Guignardia* spp agrupam-se preferencialmente em função da metodologia de isolamento (de lesão de MPC ou de folhas assintomáticas) do que em função do seu hospedeiro, da região ou da época de isolamento. Outra exceção encontrada, são os 10 isolados de lesão de MPC que agrupam-se com a maioria dos endofíticos (grupo 3). Este achado sugere que em lesão de MPC podem-se encontrar diferentes isolados coexistindo, e testes de patogenicidade devem ser realizados para esclarecer se estes 10 isolados de *G. citricarpa*, são patogênicos ou endofíticos colonizando uma lesão previamente estabelecida.

Estas observações sugerem primeiro, que os isolados endofíticos de *G. citricarpa*, não sejam patógenos de MPC latentes nestas plantas, como sugerido inicialmente. Os resultados de RAPD também mostram claramente uma grande

diversidade genética entre endofíticos de *G. citricarpa* de diferentes localidades, gerando 4 grupos (grupo 3, 5, 6 e 7). Interessante observar que os isolados EC131 (grupo 6) e EC145 (grupo 7) já haviam sido relatados por Glienke (1995) como distintos geneticamente dos demais isolados endofíticos de *G. citricarpa*, mesmo sendo isolados do mesmo pomar e na mesma época dos demais. Se na época uma possível explicação era o tamanho amostral reduzido, frente a uma grande variabilidade genética existente, na situação atual, tal hipótese parece pouco provável, mas reforça a existência de grande variabilidade genética entre os isolados endofíticos de *G. citricarpa*. Por outro lado, entre os isolados patogênicos do grupo 1, uma maior similaridade genética pode ser observada. Isto reforça a idéia de não patogenicidade, em relação às plantas cítricas, dos isolados endofíticos de *G. citricarpa*, pois estes poderiam estar sob pressão seletiva menor do que os patogênicos, enquanto habitantes desta planta hospedeira. Assim, espécies de *Guignardia* potencialmente patogênicas de outros hospedeiros, poderiam colonizar endofiticamente plantas cítricas, sem no entanto, possuírem capacidade de desencadear lesões nestes hospedeiros.

Segundo Freeman & Rodriguez (1993), variações fenotípicas e genotípicas em fungos tem sido observadas muitas vezes. Entretanto, ainda não é conhecido o papel desta variação e portanto não é possível formular uma hipótese precisa sobre o grau de variação genética necessária para o impacto no estilo de vida do fungo, especialmente, por esta base genética não ser conhecida. Porém, as observações aqui feitas sobre variabilidade genética destes isolados, sugere que a relação patógeno x endofítico no fungo *G. citricarpa*, seja diferente daquela sugerida por Shaw et al. (1998) para o fungo taxonomicamente relacionado, *Phyllosticta ampellicida*. Neste caso, quando o fungo infecta tecidos imaturos, os sintomas de doença são expressados como lesões necróticas. Quando infecta tecidos maduros, o tecido do fungo é limitado a endofitismo assintomático. Parece pouco provável que tal situação pudesse estar ocorrendo nestes isolados de *G. citricarpa*, uma vez que a maioria dos isolados encontrados em lesões necróticas da MPC (patogênicos), apresentam baixa similaridade genética (apenas 10 %) quando comparados com a grande maioria dos isolados encontrados em folhas sadias de citros (endofíticos). Claramente, tal distinção não é

dependente do estado fisiológico da planta, mas sim de diferenças significativas nas populações estudadas, não tratando-se de uma mera transição no estilo de vida deste fungo, dependente de condições ambientais ou estímulos diversos.

Se as observações feitas por Kuo & Hoch (1996b) para a interação *Phyllosticta ampellicida* - uva, fossem aplicadas em *G. citricarpa* (*Phyllosticta citricarpa*) - citros, todos os isolados obtidos de lesão (patogênicos) e os de plantas assintomáticas (endofíticos) deveriam pertencer a um mesmo grupo ou a grupos aleatórios, independente de sua origem de isolamento, ou se agrupassem em função de suas regiões ou épocas de isolamento, quando comparados por RAPD. Sendo assim, os dados de similaridades genéticas do presente trabalho, sugerem que esta não é a única explicação para os achados no sistema *G. citricarpa* – citros, mas que os isolados endofíticos isolados neste trabalho, provavelmente não seriam capazes de desencadear sintomas da doença, independente do estado fisiológico ou de desenvolvimento que a planta se encontrasse. Sugere-se assim, duas possibilidades: a) Em citros podem ser encontradas pelo menos 3 populações de *G. citricarpa* coexistindo livremente, sendo que os isolados endofíticos poderiam colonizar inclusive outros hospedeiros; b) Os isolados endofíticos de citros, são na verdade pertencentes a outra espécie, que poderia ser patogênica de outras culturas, habitando citros de forma assintomática (endofítica), tendo uma relação incompatível, sendo estes hospedeiros a fonte de inóculo para infectar hospedeiros compatíveis.

A pouca similaridade genética encontrada entre a linhagem referência do CBS e os isolados endofíticos de *G. citricarpa*, bem como a alta similaridade genética encontrada entre estes e os isolados de *Guignardia* de outros hospedeiros (patogênicos e endofíticos), sugere pouca especificidade dos endófitos a um hospedeiro. Este fato, juntamente com o achado de isolados geneticamente pertencentes ao grupo endofítico em lesões de MPC (possivelmente oportunistas), mas a falta de isolados geneticamente pertencentes ao tipo patogênico em plantas sadias (na forma de endófitos) reforça a hipótese de não serem os endofíticos, patógenos latentes de MPC e que possam inclusive não pertencer a espécie *G. citricarpa*, embora enquadram-se na classificação adotada para esta espécie (Van Der AA, comunicação pessoal). Esta hipótese está de acordo

com as observações de Bisset & Palm (1989) e Leuchtmann et al. (1992), de que espécies de *Guignardia* são parasitas específicas para um espécie ou gênero hospedeiro. Caso contrário, se os endofíticos de citros fossem patógenos de MPC latentes nestas plantas, tal especificidade não seria verdadeira, uma vez que baseados em similaridade genética, os isolados patogênicos de goiabeiras (*G. psidii*), poderiam ser causadores de MPC em citros. De qualquer forma, tais dados sugerem uma revisão na taxonomia deste gênero.

4.4. Diagnóstico Molecular de Isolados Patogênicos

4.4.1. Clonagem e Sequenciamento

Considerando que os isolados endofíticos de citros não são patógenos de MPC latentes, objetivando-se a obtenção de um marcador molecular exclusivo de isolados patogênicos de *G. citricarpa*, e observando-se que existem poucas bandas de RAPD monomórficas e muitas bandas exclusivas de isolados patogênicos de *G. citricarpa* (Figuras 1 a 6), o DNA do isolado PC13 foi utilizado para amplificação com o primer OPX14, e obtenção de uma banda (p373) exclusiva dos isolados patogênicos (Figura 8). Tal banda foi recuperada do gel, clonada e sequenciada (Figura 9). A sequência obtida mostrou que o fragmento possui 373 pares de base. A comparação desta sequência com outras disponíveis nos bancos de dados na Internet (por exemplo no “GeneBank”), não mostrou homologia considerável. Embora esta sequência apresente um ORF (*Open Reading Frame*) que compreende as bases 247 a 351, a sequência de 35 aminoácidos resultante da tradução, não apresenta homologia com outras proteínas conhecidas, e logo, não deve ser um produto real. Além do mais, a sequência de aminoácidos parece ser muito pequena para representar uma proteína funcional.

A sequência é composta aparentemente de DNA repetitivo, como as repetições GAAG, GGAAGG, GGAG, GAGG, TTA e TTC que podem ser observadas na Figura 9. Tal achado é possível, uma vez que marcadores de RAPD são obtidos também de regiões contendo DNA repetitivo (Williams et al., 1990). Assim, a pressão de seleção contra novas mutações deve ser mínima, possibilitando rápida evolução, e semelhantemente às regiões ITS dos genes ribossomais, podem variar dentro da mesma

espécie, discriminando populações diferentes (Cooley, 1991 ; Samuels & Seifert, 1995; Goosen & Debets, 1996; Groppe & Boller, 1997; Reiss et al. 1998).

Figura 8: RAPD de 25 isolados de *Guignardia* spp com o “primer OPX14, mostrando a banda de 373 pb. Esta banda foi encontrada exclusivamente nos isolados patogênicos de *G. citricarpa* pertencentes ao grupo 1 (Figura 7).

5'

```

1  ACAGGTGCTGAAGTGTGAGTGTCGAAGGTGGAAATTGAGGTGAGGTTGACGGCGTCTGCG
61  GGAGAGGCGAGTAGCGGGTGCTGTAGAAGTTGTATGATCCGCGGTGCGCGTTGGGGTACA
121 GAGAGTGGAAGGAGACAGCGCTGCAACAGGGAAGGTTAGACTTTCAATTGAGCCGGAGCT
181 GGAGCGGTTCACCCCGAATCACGTGCATTCAGGCGACTTTGGATCATCAATCACCCGGA
241 TTTTATGATGGGTGCTCTGGAAATAAGAGTGAAGAAATGTAGGTTATTAATCTATCTGCCGTA
301 GAAAAGCGAGTCGTCAATGATTATACCAATCGTGACTATGATACCTCATGAAGCCGCCCC
361 ATGCAGCACCTGT
  
```

3'

Figura 9: Sequência de bases da banda p373 obtida por amplificação do DNA genômico do isolado PC13, com o primer OPX14. As seqüências repetidas estão destacadas em cores.

4.4.2. "Southern Blot"

O fragmento p373 foi utilizado como sonda marcada radioativamente contra o DNA genômico clivado de isolados endofíticos e patogênicos de *Guignardia* spp, para verificar se tal sequência está presente em todos os grupos, ou é capaz de diferenciá-los. A Figura 10 mostra o DNA genômico dos isolados clivados que foram utilizados no experimento de hibridação ou "Southern blot". A hibridação da membrana com a sonda do fragmento p373 apresentou um forte "background" na autoradiografia portanto não foi mostrada neste trabalho. Partiu-se assim, para a detecção dos isolados patogênicos, via PCR utilizando-se os "primers" GCP1 e GCP2.

4.4.3. PCR

A reação de amplificação realizada com 25 isolados de *Guignardia* spp com os "primers" GCP1 e GCP2 está representada na Figura 11, sendo que apenas os isolados patogênicos de *G. citricarpa* apresentaram amplificação da banda de 373 pares de base. Apenas um isolado patogênico, o PC7LS não apresentou amplificação desta banda, porém, este mesmo isolado não amplificou na reação de PCR realizada como controle positivo (Figura 12). Sendo assim, a falta de amplificação deste isolado observada na Figura 11, deve ser decorrente de falha de amplificação por problemas com o DNA do mesmo.

Figura 10: DNA de 18 isolados de *Guignardia* spp, clivado com a enzima EcoRI. M: Marcador de peso molecular, DNA λ digerido com HindIII. P373: fragmento clonado e seqüenciado.

Figura 11: Reação de amplificação com os “primers” GCP1 e GCP2 de 25 isolados de *Guignardia* spp. M: marcador de peso molecular, DNA “Ladder” de 100pb. pGEM-T: plasmídeo contendo o fragmento de 373pb clonado.

Figura 12: Reação de amplificação com os “primers” hph1 e hph2 de 25 isolados de *Guignardia* spp, como controle positivo de amplificação, realizado nas mesmas condições e ao mesmo tempo que a reação da Figura 11. M: marcador de peso molecular, DNA “Ladder” de 100 pb. pCSN43: controle positivo.

Portanto, os “primers” GCP1 e GCP2 obtidos (Item 3.10.6) são capazes de discriminar os isolados patogênicos de *G. citricarpa* dos demais isolados de *Guignardia* spp, utilizados neste trabalho. É interessante também observar, que o isolado de *G. psidii*, patógeno de goiabeira (PG1515) não apresentou amplificação da banda de 373 pb, sendo também discriminado dos isolados patogênicos de citros.

Este par de “primers” deverá futuramente ser testado para amplificação com outros microrganismos frequentemente encontrados em citros, como *Colletotrichum*, *Xylella fastidiosa* e *Phytophthora*, afim de descartar a possibilidade de amplificação desta banda nestes. Da mesma forma, o hospedeiro deverá ser testado, e finalmente testar a amplificação destes isolados inoculados em folhas de citros. Para tanto, plantas axênicas de citros estão sendo produzidas e serão em breve inoculadas.

4.5. Cariótipo Eletroforético

Para a obtenção de protoplastos foram necessárias algumas alterações no protocolo testado inicialmente (Kava-Cordeiro, 1993), em virtude da baixa eficiência de protoplastização observada.

Foram obtidos dois protocolos para separação dos cromossomos em *G. citricarpa* acima de 1 Mb e um para visualização de mini-cromossomos (abaixo de 1 Mb). Na análise do cariótipo eletroforético, foram utilizados os isolados EC86, EC216 e PC4 (Figuras 13 e 14). Na Figura 13 os cromossomos do isolado EC86 foram separados por 75 horas a 100V, com pulsos em rampa de 150 a 600 segundos, sendo observados 8 cromossomos, sendo que duas delas (setas) possuem maior intensidade. Nesta Figura observa-se que os cromossomos maiores de *G. citricarpa* estão localizados em uma zona de compressão, não sendo portanto totalmente separados.

Para reduzir esta compressão, foi utilizado o protocolo 2 (que apresenta um pulso final de 2.200 segundos a 48V por 24 horas) na separação dos cromossomos dos isolados EC86, EC216, PC16 e PC4 (Figura 14). Com esta alteração foi possível um melhor separação dos cromossomos maiores de *G. citricarpa*, porém apenas 7 bandas foram evidenciadas em cada isolado. Entretanto, como o EC86 também está representado neste gel e apresentando 7 bandas, acredita-se que com este protocolo (2) um cromossomo não foi devidamente separado.

Assim, sugere-se que estes isolados do fungo *G. citricarpa* possuem pelo menos 8 cromossomos, podendo este número ser superior, uma vez que segundo Brody & Carbon (1989) e Wrestler et al. (1996), banda com maior intensidade pode representar a existência de dois ou mais cromossomos nesta.

Portanto, o protocolo que resultou em melhor visualização dos cromossomos deste fungo, foi o protocolo 1, totalizando 99 horas de corrida, sendo que o protocolo 2 (com total de 75 horas) apresentou melhor separação dos cromossomos de maior peso. Porém, alterações devem ser feitas futuramente nestes protocolos, a fim de proporcionar a separação de todos os cromossomos deste fungo.

Figura 13: Eletroforese de Campo Pulsado do isolado EC86 realizada com o protocolo 1. Setas indicam bandas de maior intensidade. SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MSE: *Aspergillus nidulans*.

Figura 14: Eletroforese de Campo Pulsado dos isolados EC86, EC216, PC16 e PC4, realizada com o protocolo 2. SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MSE: *Aspergillus nidulans*.

O peso molecular de cada cromossomo do isolado EC86 foi calculado utilizando como padrão *S. cerevisiae* e *A. nidulans*, e está representado na Tabela 3, sendo o maior de 3,7 Mb e o menor de 1,1 Mb. Se forem considerados apenas 1 cromossomo por banda, o tamanho total do genoma destes isolados de *G. citricarpa*, será de 21,5 Mb. O número de cromossomos e o tamanho do genoma encontrados nestes isolados, podem ser subestimados em função da não separação de todos os cromossomos talvez existentes. Além disto, a zona de compressão visualizada na Figura 13 pode estar contribuindo para esta subestimativa, visto que os pesos calculados pelo programa para os cromossomos de *A. nidulans* neste gel, estão abaixo dos descritos na literatura para este fungo (Brody & Carbon, 1989).

Desta forma, ajustes futuros nestes protocolos podem revelar um tamanho maior para o genoma de *G. citricarpa*. Isto seria esperado se compararmos estes valores com aqueles encontrados para outros fungos, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 3: Tamanho, em Megabases, dos 8 cromossomos encontrados no isolado endofítico EC86 de *G. citricarpa*. No total, o genoma compreende 21,5 Mb.

CROMOSSOMO TAMANHO	
I	3,738
II	3,531
III	3,423
IV	3,186
V	2,703
VI	2,062
VII	1,806
VIII	1,138
8 Cromossomos	21,5 Mb

Tabela 4: Número de cromossomos e tamanho do genoma de 5 fungos descritos na literatura.

FUNGO	Nº DE CROMOSSOMOS	GENOMA (em Mb)	REFERÊNCIA
<i>Neurospora crassa</i>	7	47	Orbach et al. (1988)
<i>Aspergillus nidulans</i>	8	31	Brody & Carbon, (1989)
<i>Magnaporthe grisea</i>	7	Até 40	Skinner et al. (1993)
<i>Pythium sylvaticum</i>	13	37	Martin (1995)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Variável	Até 56,1	Gomez et al. (1997)

A fraca visualização das bandas no gel de Eletroforese de Campo Pulsado dos isolados endofíticos e especialmente dos patogênicos, deve-se a baixa concentração de protoplastos nos “plugs”, causada pela dificuldade de protoplastização. Foi observada uma maior resistência dos isolados patogênicos de *G. citricarpa* a ação da enzima lítica Novozyme, e conseqüente dificuldade de protoplastização, quando comparados aos endofíticos. Tal resistência foi em parte contornada adicionando-se 5 ppm do fungicida Fongorene no meio de cultura líquido para o crescimento micelial. O Fongorene é um fungicida a base de Piroquilon (1,2,5,6-tetrahydropyrrole[3.2.1-*ij*]quinolin-4-one) que inibe a síntese de melanina, causando maior susceptibilidade do micélio ao ataque de enzimas líticas. Tal observação de que agentes inibidores da síntese de melanina, tornam as hifas do fungo mais susceptíveis ao ataque de enzimas líticas, já foi utilizado como estratégia de controle biológico do fungo *Monilinia laxa* por *Penicillium frequentans* (Melgarejo et al., 1988; De Cal & Melgarejo, 1994).

Observando a Figura 14 pode-se perceber que os isolados PC4 e PC16 obtidos de lesão de MPC e que agruparam-se com os endofíticos, tanto pelos dados do RAPD como pelo tipo de esporulação (itens 4.3 e 4.6.2), possuem o mesmo cariótipo eletroforético dos isolados endofíticos ensaiados neste gel. Da mesma forma, estes isolados apresentaram menor dificuldade na protoplastização do que os isolados patogênicos do grupo 1 do RAPD (Figura 7). Desta forma, não pode-se considerá-los

patogênicos neste trabalho, e assim, não foi possível realizar a comparação dos cariótipos eletroforéticos dos isolados endofíticos com os patogênicos de *G. citricarpa*, nem com os demais isolados de *Guignardia*. Entretanto, nenhum polimorfismo foi observado entre estes isolados quanto a presença de minicromossomos (Figura 15), quando o protocolo 3 foi utilizado para separar preferencialmente cromossomos com peso molecular inferior a 1 Mb. Tal ausência de polimorfismo pode ou não ser verdadeira. Isto porque a falta de minicromossomos neste gel, poderia ser decorrente do longo tempo de cultivo *in vitro* destes isolados. Segundo Orbach et al. (1996), Miao (1990), Valent & Chumley (1991), Masel et al. (1993), Leclair et al. (1996) e Covert et al. (1996), estes cromossomos supernumerários ou minicromossomos podem não ser essenciais, não obedecerem as leis de segregação Mendelianas e por fim, podem ser perdidos após longos cultivos em meio de cultura padrão.

Para poder-se afirmar que estes isolados de *G. citricarpa* não possuem minicromossomos, talvez o indicado seria que o cariótipo eletroforético destes fungos fosse realizado imediatamente após o seu isolamento na natureza. Tais cuidados não foram possíveis neste trabalho, uma vez que foi necessário um longo período para a otimização da técnica, tanto da obtenção dos protoplastos, como das condições ideais para separação dos cromossomos, pois tais dados para este fungo, não estavam disponíveis na literatura. Também não foi possível utilizar o estoque inicial de tais isolados, realizado no momento do isolamento, pois este fungo possui baixa taxa de sobrevivência após 6 meses de estocagem, necessitando ser constantemente repicado.

Este problema só foi em parte amenizado, quando modificou-se a metodologia de estocagem, sendo utilizada aquela descrita no item 3.7.

4.6. Caracterização Morfológica

4.6.1. Curva de Crescimento

A Figura 16 mostra as médias de 3 repetições, dos diâmetros apresentados por 15 isolados de *Guignardia* spp. As médias também são apresentados na Tabela 5.

A análise estatística apresentada na Tabela 6, revela que há diferenças entre os diâmetros apresentados pelos isolados, ao longo dos 24 dias de crescimento.

Revela também, a existência de interação entre os tratamentos, uma vez que o F foi significativo mesmo a 1% de probabilidade.

Figura 15: Eletroforese de Campo Pulsado realizada com o protocolo 3, para visualização de mini-cromossomos. SC: *Saccharomyces cerevisiae*; MSE: *Aspergillus nidulans*.

Figura 16: Média de 3 repetições das taxas de crescimento de 21 isolados de *Guignardia* spp apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Taxas de crescimento, em centímetros, de 21 isolados de *Guignardia* spp. Média de 3 repetições.

ISOL/DIA	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
PG1515	1,3	2,0	2,6	2,9	3,5	4,4	5,6	6,9	7,5	8,1	8,2	8,2
PC13	1,2	3,0	4,5	5,7	6,6	7,0	7,6	7,8	7,9	8,1	8,3	8,3
EC15	1,2	2,1	2,8	3,5	4,2	4,8	6,0	6,5	6,9	7,1	7,3	7,4
PC16	1,4	1,7	2,3	2,8	3,5	4,2	5,4	6,2	6,9	7,6	7,7	7,8
PC18	0,9	2,8	4,4	5,7	6,4	6,7	7,1	7,3	7,2	7,3	7,5	7,5
PC19	0,5	1,7	3,4	4,3	4,8	4,7	4,8	4,8	5,1	5,3	5,7	5,9
EC45	1,0	1,7	2,2	2,7	3,3	3,9	4,7	5,7	6,4	7,0	7,4	7,8
EC131	1,0	1,8	2,6	3,4	4,7	7,1	7,1	7,8	7,9	8,1	8,2	8,2
EC145	0,8	1,8	2,3	2,7	3,6	4,8	6,3	7,0	7,5	7,9	8,0	8,0
ECPR3	1,6	2,4	3,4	4,4	5,2	5,9	6,3	6,8	7,2	7,7	7,9	8,1
ECPR6	1,5	2,5	3,3	4,2	5,2	6,1	6,6	6,8	7,2	7,5	7,8	7,8
ECPR8	1,4	2,7	3,3	4,0	4,6	5,0	5,0	5,8	6,0	6,2	6,4	6,4
ECPR10	1,4	2,2	2,5	3,3	3,7	3,9	4,0	4,1	4,2	4,3	4,5	4,5
ECPOA5	1,5	3,0	3,9	5,2	6,0	6,6	7,1	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8
ECOL23	1,0	1,4	3,1	2,7	3,7	4,4	5,5	6,4	7,0	7,6	7,9	7,9
ECN22	0,8	3,8	4,7	5,7	7,0	7,6	8,1	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
EG3Z	0,8	4,0	5,4	6,0	7,5	8,3	8,3	8,3	8,4	8,4	8,5	8,5
PC97013	1,0	3,0	4,5	5,9	7,0	7,3	7,3	7,4	7,4	7,4	7,4	7,5
PC97014	0,8	1,8	2,4	3,0	3,5	3,5	3,7	4,2	4,6	4,7	5,1	5,4
ECA1-16	1,0	1,5	2,2	2,8	3,4	5,3	4,6	5,4	6,1	6,8	7,1	7,5
ECA5.7	1,2	1,9	2,3	3,0	4,6	5,8	7,1	8,0	8,5	8,5	8,5	8,5

Tabela 6: Análise de variância (parcelas subdivididas) dos diâmetros de colônia de 3 repetições dos 21 isolados de *Guignardia* spp, ao longo dos 24 dias de crescimento.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos	2	14,5377		
Tratamento	20	599,9811	29,99906	20.601**
Resíduo (a)	40	58,2484	1,45621	
Parcela	62	672,7672		
Dias	11	3198,9300	290,8118	6298.854**
DxT	220	50059,8500	227,5448	4928.519**
Resíduo (b)	462	21,3303	0,046169	
Total	755	53952,8800		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Como pode ser observado na Tabela 6, as diferenças entre os diâmetros das colônias dos 21 isolados de *Guignardia* spp analisados, ao longo de 24 dias de crescimento, são significativos a 1% segundo análise de variância. Foi significativa também a interação entre os isolados e o tempo de crescimento, indicando que aqueles comportam-se diferentemente em função do tempo de crescimento observado.

Esta interação pode ser visualizada da Figura 16, principalmente em 10 dias de crescimento, onde os 21 isolados analisados, parecem dividir-se em dois grupos. Tais diferenças foram estão testadas com análises de variâncias individualizadas, levando em conta apenas dois tempos de crescimento, ou seja, como os isolados comportaram-se em 10 ou 12 dias de crescimento (Tabelas 7 e 8). Este último foi analisado por ser este o tempo onde o primeiro isolado atingiu o máximo de crescimento permitido pelo diâmetro da placa de Petri, ou seja, 8,5 centímetros.

Como os valores de F foram significativos a 1% em ambas as análises (Tabelas 7 e 8), as médias dos diâmetros dos 21 isolados em ambos os tempos de crescimento, foram comparadas pelo Teste Tukey, conforme apresentado nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 7: Análise de variância dos diâmetros de colônia de 3 repetições de 21 isolados de *Guignardia* spp, após 12 dias de crescimento.

F.V.	G.L.	SQ	QM	F
Tratamento	20	115,393	5,76965	13,41**
Erro	42	18,067	0,4302	
Total	62	133,46		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 8: Análise de variância dos diâmetros de colônia de 3 repetições dos 21 isolados de *Guignardia* spp, após 10 dias de crescimento.

F.V.	G.L.	SQ	QM	F
Tratamento	20	112,29	5,6145	13,24**
Erro	42	17,81	0,424	
Total	62	130,1		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 9: Comparação das médias das 3 repetições dos diâmetros de 21 isolados de *Guignardia* spp, após 12 dias de crescimento. Teste Tukey, com diferença mínima significativa igual a 2,4 centímetros.

ISOLADO	MÉDIA
EG3Z	8,3 A
ECN22	7,6 AB
PC97013	7,3 AB
PC13	7,0 ABCD
PC18	6,7 ABCD
ECPOA5	6,6 ABCD
ECPR6	6,1 ABCDEF
ECPR3	5,9 BCDEF
ECA5.7LP	5,8 BCDEFG
EC131	5,4 BCDEFG
EC15	4,8 CDEFG

EC145	4,8	CDEFG
ECPR8	4,8	CDEFG
PC19	4,7	CDEFG
PG1515	4,4	DEFG
ECOL23	4,4	DEFG
PC16	4,2	EFG
ECA1-16	4,0	EFG
EC45	3,9	FG
ECPR10	3,9	FG
PC97014	3,5	G

Tabela 10: Comparação das médias das 3 repetições dos diâmetros de 21 isolados de *Guignardia* spp, após 10 dias de crescimento. Teste Tukey, com diferença mínima significativa igual a 2,3 centímetros.

ISOLADO	MÉDIA
EG3Z	7,5 A
ECN22	7,0 AB
PC97013	7,0 AB
PC13	6,6 ABC
PC18	6,4 ABCD
ECPOA5	6,0 ABCD
ECPR3	5,2 BCDE
ECPR6	5,2 BCDE
PC19	4,8 BCDE
EC131	4,7 BCDE
ECPR8	4,6 CDE
ECA5.7LP	4,6 CDE
EC15	4,2 DE
ECPR10	3,7 E
ECOL23	3,7 E
EC145	3,6 E
PG1515	3,5 E
PC16	3,5 E
PC97014	3,5 E
ECA1-16	3,4 E
EC45	3,3 E

Pelo teste de médias (Tukey) não foi possível separar os isolados em dois grupos, como a Figura 16 sugeria inicialmente, porém, percebe-se há diferenças significativas entre alguns isolados, especialmente com 10 dias de crescimento (Tabela 10). Entretanto, as diferenças observadas não coincidem com o tipo de isolado analisado,

ou seja, endofítico ou patógeno. Por exemplo, as médias de crescimento apresentadas pelos isolados PC97014 e PC97013 com 10 dias, são significativamente diferentes, mesmo sendo ambos isolados patogênicos de *G. citricarpa* da mesma época e região (Tabelas 1 e 10) e compartilharem o mesmo agrupamento quando marcadores de RAPD são utilizados (Figura 7). Por outro lado, as médias apresentadas pelo isolado PC97014 e EC145 não diferem significativamente, apesar de pertencerem a grupos distintos na comparação por RAPD (Figura 7). Sendo assim, se for levado em consideração que os isolados do grupo 1 (Figura 7) são patogênicos, enquanto os isolados do grupo 2 e 3 (Figura 7) são endofíticos, estes dados não estão de acordo com as observações de McOnie (1964) de que os isolados patogênicos crescem mais lentamente que os não patogênicos, em meio de cultura.

Foi observado também, que os isolados apresentaram grande variação na morfologia das colônias entre eles, bem como entre as repetições do mesmo isolado, como mostram as Figuras 17 a 23. Esta variação bem como a presença de setores, foram freqüentemente observadas em isolados de *Guignardia* (Figuras 20, 21 e 23) e já foram relatadas para diversos fungos fitopatogênicos (Valent & Chumley, 1991).

Figura 17: Reverso das placas de duas repetições do isolado ECPR6 de *G. citricarpa*, mostrando as variações na morfologia e taxa de crescimento das colônias.

A**B** **C**

Figura 18: A e B) Reverso das placas de duas repetições do isolado EC145, mostrando a variação na morfologia das colônias. C) Morfologia do isolado EC145.

Figura 19: Reverso das placas de duas repetições do isolado PC13 mostrando variações na morfologia das colônias.

A

B

Figura 20: Reverso das placas de duas repetições do isolado EG3Z, mostrando variações na morfologia das colônias. Em B pode ser observado um setor deteriorado (seta).

Figura 21: Reverso das placas de duas repetições do isolado PC97013 mostrando as variações na morfologia das colônias.

A

B

Figura 22: A e B mostram duas placas obtidas a partir do mesmo inóculo do isolado ECPR8, ambas em MC.

Figura 23: A) Isolado EC131 com 4 semanas de crescimento em MC, apresentando incompatibilidade vegetativa, pouca produção de esporos e fortemente pigmentado. B) Setor do isolado EC131 com 3 semanas de crescimento, apresentando contato entre os inóculos, grande produção de esporos e coloração menos intensa. C) Uma terceira colônia do isolado EC131 com 2 semanas de crescimento.

A Figura 22 mostra as diferenças observadas em duas placas obtidas a partir do mesmo inóculo do isolado ECPR8 de *G. citricarpa*, onde não apenas a coloração é contrastante, como também a taxa de crescimento e a produção de esporos. Na Figura 23, o que mais chama a atenção, é que do isolado EC131 (Figura 23C) foram obtidos dois setores, sendo que um apresenta incompatibilidade vegetativa (Figura 23 A), enquanto no outro setor, pode-se observar sobreposição entre os inóculos (Figura 23 B). Tais observações levaram a suposição de heterocariose no isolado EC131 (Figura 23C), sendo que estes dois setores poderiam ser resultantes da separação de tais núcleos. Se assim fosse, o mais provável seria que estes isolados apresentassem padrões eletroforéticos distintos em uma reação de RAPD. Tal diferença não foi observada (Figura 24), e outros experimentos devem ser realizados futuramente, na tentativa de explicar tais observações.

Figura 24: Perfil de RAPD do isolado EC131 e dos dois setores observados na Figura 23. Reação de amplificação com o “primer” OPX12. M: marcador de peso molecular, Ladder de 100 pb.

4.6.2. Tipo de Esporulação *in vitro* e Tamanho dos Esporos

As Figuras 25 e 26 mostram variações nos esporos produzidos por isolados de *Guignardia* spp, que estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Tipos de estruturas de reprodução produzidas *in vitro* por 47 isolados de *Guignardia* spp.

ISOLADO	ASSEXUAL	SEXUAL	ESPERMÁCIO
EC1	++++	++++	-
EC131	+++	+	+
EC145	++	-	-
EC171	++++	+++	+
EC224	+++	+	-
EC68	+++	+++	-
EC86	++	++	-
ECN22	+++	-	-
ECOL23	+++	++	-
ECPOA4	++	+++	-
ECPOA5	+++	-	-
ECPOA6	+++	+++	+
ECPOA7	++	+++	-
ECPOA8	++++	++++	-
ECPR10	++++	-	-
ECPR11	+++	-	+
ECPR12	+++	-	-
ECPR3	+++	-	+
ECPR5	++++	-	+
ECPR6	++++	-	-
ECPR8	+++	-	+
ECRP1	++++	+++	+
ECRP2	+	++	-
ECRP6	++	++	-
ECTO1	+++	-	-
EG2Z	++	-	-
EG3Z	++	++	-
PC1/96	++	++	-
PC13	++++	-	+++
PC23	+++	-	++
PC45	+++	+++	+
PC48	+	++	-
PC50	++	+++	+
PC58	++	++	-

PC97014	++++	-	++++
PCFM	++++	-	++++
PCP1	+++	-	+++
PCP2	++++	-	++++
PCP3	++++	-	++++
PCP5	++++	-	+++
PCP6	++++	-	++++
PCP7	++++	-	+++
PCP8	+++	-	++++
PCP9	++++	-	++++
PCRJ2	++++	-	++++
PCRJ3	++++	-	++++
PG1513	+++	+++	-

-: ausência; +: raramente encontrados; ++: baixa frequência; +++: encontrados em alta frequência; ++++: encontrados em abundância.

Observando a Tabela 11 pode-se perceber que há uma nítida diferença entre os tipos de esporos produzidos pelos isolados de *Guignardia* spp. Os resultados do tipo de estruturas de reprodução produzidos *in vitro* pelos isolados discrimina-os em 4 grupos. Aqueles que produzem conídios e também ascósporos (grupo 1), aqueles que produzem preferencialmente estruturas do tipo conidial (grupo 2), aqueles que produzem conídios e também microconídios em grande quantidade (grupo 3) e por fim, aqueles que produzem somente esporos sexuais (grupo 4), como apresentado na Figura 27.

Estes resultados tem uma certa relação com os dados de RAPD (Figura 7). Os grupos 1 e 4 quanto ao tipo de esporulação, possuem isolados pertencentes ao grupo 3 do RAPD. O grupo 2 de esporulação, possuem isolados pertencentes aos grupos 2 e 3 do RAPD, e o grupo 3 de esporulação compreende isolados exclusivamente do grupo 1 de RAPD, os patogênicos. Interessante também observar, que aqueles isolados de lesão de MPC que agruparam com os endofíticos de citros, são semelhantes a estes, também por esta característica analisada. Estes resultados, ao contrário daqueles apresentados para taxa de crescimento, está de certa forma de acordo com os observados para McOnie (1964). Segundo este autor, os isolados de *G. citricarpa* agrupavam-se segundo o tipo de esporulação, sendo que os patogênicos não produziam a forma perfeita, enquanto os não patogênicos, apresentavam tanto a produção de esporos assexuais como sexuais.

A **B** **C**

Figura 25: Esporos assexuais de *G. citricarpa*. A) Conídios do isolado ECPR6 (seta), produzidos em grande quantidade. Aumento: 16 x. B) Conídios do isolado ECPR10 (seta). Aumento 40 x. C) Microconídios (espermácios) do isolado PC13 (seta). Aumento 100 x.

A

B

Figura 26: Estruturas de reprodução sexual do isolado EC145 de *G. citricarpa*. A) Pseudotécio rompido, expondo ascos jovens (seta). B) Asco bitunicado (seta) mostrando os ascósporos em seu interior.

produção *in vitro* de esporos assexuais e sexuais, e aqueles com produção apenas da forma imperfeita. Portanto, neste trabalho pode-se apenas distinguir os isolados aparentemente patogênicos dos demais, pela produção de grande quantidade de microconídios e a total ausência de esporos sexuais *in vitro* nos patogênicos. A patogenicidade ou não destes isolados, precisa ser verificada para confirmação dos resultados obtidos.

Na Tabela 12 observa-se a variação encontrada quanto ao tamanho das estruturas de reprodução nos diferentes isolados de *Guignardia* spp.

Tabela 12: Tamanho, em micrômetros, das estruturas de reprodução de 43 isolados de *Guignardia* spp.

ISOLADO	CONÍDIO	ASCÓSPORO	ESPERMÁCIO
PC1	13,4 x 8,7 P ¹	19,2 x 8,0 P	---
PC13	11,9 x 6,8 A	---	7,6 x 1,7 A
EC131	11,5 x 7,1	17,3 x 6,1 R	6,4 x 2,0 R
EC171	12,1 x 7,7 A	19,9 x 7,0	7,0 x 1,7 R
EC224	10,4 x 7,0	14,9 x 7,0 R	---
PC23	11,2 x 8,0	---	7,5 x 1,3 P
EG2Z	12,0 x 7,5 P	---	---
EG3Z	12,9 x 7,6 P	21,0 x 7,0 R	---
PC50	12,6 x 7,4 P	16,5 x 7,0	7,0 x 1,7 R
EC86	11,8 x 7,3 P	14,6 x 7,0 P	---
PG1513	12,7 x 8,3	16,8 x 7,0	---
PCC2	12,0 x 8,1 A	---	7,8 x 1,5 A
PCC3	12,6 x 7,6 A	---	7,2 x 1,6 A
PCFM	12,3 x 8,7 A	---	8,0 x 1,3 A
PC45	11,8 x 7,6	20,4 x 8,0	7,9 x 1,7 R
PC48	14,0 x 7,0 R	16,6 x 7,6 P	---
PC58	12,6 x 7,3 P	16,6 x 5,7 P	---
EC68	12,2 x 7,0	18,7 x 7,9	---
ECOL23	13,1 x 7,5 P	17,5 x 7,0 P	---
PCP1	11,1 x 7,6	---	7,9 x 1,7
PCP3	11,5 x 7,4 A	---	7,9 x 1,7 A
PCP5	13,0 x 7,3 A	---	8,3 x 1,7
PCP6	12,2 x 8,7 A	---	7,8 x 1,7 A
PCP7	12,7 x 7,4 A	---	7,6 x 1,7
PCP8	12,2 x 7,0	---	7,8 x 1,7 A

PCP9	12,9 x 7,1 A	---	8,1 x 1,5 A
ECPOA4	12,8 x 7,2 P	18,1 x 7,0	---
ECPOA5	11,2 x 7,7	---	---
ECPOA6	12,9 x 7,5	16,1 x 7,0	7,0 x 1,7 R
ECPOA7	12,0 x 7,8 P	17,5 x 7,0	---
ECPOA8	12,0 x 8,2 A	18,2 x 7,7 A	---
EC1	11,1 x 8,2 A	17,6 x 7,0 A	---
ECPR10	10,9 x 8,7 A	---	---
ECPR11	12,2 x 9,1	---	6,1 x 1,0 R
ECPR12	12,9 x 7,0	---	---
ECPR3	10,9 x 7,3	---	10,1 x 1,7 R
ECPR5	12,7 x 8,9 A	---	8,7 x 1,7 R
ECPR6	11,5 x 8,5 A	---	---
ECRJ2	13,6 x 7,6 A	---	8,1 x 1,8 A
ECRP1	12,6 x 7,4 A	18,0 x 7,0	7,0 x 1,7 R
ECRP2	14,0 x 7,0 R	18,7 x 7,0 P	---
ECRP6	11,7 x 7,0 P	18,1 x 7,0 P	---
ECTO1	12,5 x 7,6	---	---

[†] A letra após o número indica a quantidade encontrada:

A: Abundante; P: Pouco; R: Raro. Quando nenhuma letra é indicada, significa quantidade normal.

4.6.3. Curva de Germinação *in vitro*

As Tabelas 13 a 15 mostram as taxas de germinação dos conídios dos isolados PC13, ECPR8 e EC145 respectivamente. Observa-se baixa taxa de germinação dos conídios, sendo superior para o isolado ECPR8 que os demais. Nota-se também, que neste isolado, parece haver efeito de inibição de germinação em função da concentração semeada (Tabela 14). Porém, quando os conídios foram previamente lavados com água destilada para retirada de possíveis substâncias inibidoras da germinação, como sugerido por Kuo & Hoch (1995), não observou-se aumento na taxa germinação (Tabelas 13 e 14, com 4 semanas).

Estas baixas taxas de germinação estão de acordo com outra espécie deste gênero, *Phyllosticta ampellicida*, e dificultaram a maioria dos experimentos realizados. Tal dificuldade só foi contornada quando os esporos passaram a ser germinados em pequenas quantidades de meio de cultura líquido em garrafas de polistireno para cultura de células, de maneira estática. Tal observação, e a praticamente ausência de germinação em meio líquido sob agitação, está de acordo com outra espécie, *G. ampellicida*, que

segundo Kuo & Hoch (1996a), só apresenta germinação dos esporos em substratos específicos, que permitam a adesão prévia dos mesmos. Estes dados sugerem assim, que em *G. citricarpa*, a geminação dos esporos é igualmente dependente de adesão.

A Figura 28 mostra um conídio do isolado PC13 germinando. Todos os conídios observados, possuíam germinação apical.

Tabela 13: Porcentagem de germinação dos conídios do isolado PC13, com 2, 3 e 4 semanas de crescimento a 28°C.

CON./ML	2 SEMANAS	3 SEMANAS	4 SEMANAS
1×10^5	0,07	0,04	0,05
1×10^4	0,16	0,09	0,07
1×10^3	0,15	0	0
1×10^2	0,8	0	0
1×10^1	0	0	0

Tabela 14: Porcentagem de germinação dos conídios do isolado ECPR8, com 3 e 4 semanas de crescimento a 28°C.

CON./ML	3 SEMANAS	4 SEMANAS
1×10^5	1,0	1,0
1×10^4	4,19	1,76
1×10^3	6,7	3,69
1×10^2	22,3	4,36
1×10^1	8,9	18,75

Tabela 15: Porcentagem de germinação dos conídios do isolado EC145 com 4 semanas de crescimento a 28°C.

CON./ML	4 SEMANAS
1×10^4	0,035
1×10^3	0,013
1×10^2	0
1×10^1	0

Figura 28: Conídios do isolado PC13 germinando. Notar a germinação apical (setas).

4.6.4. Germinação *in vivo*

A Figura 29 mostra conídios do isolado EC145 germinando na superfície de uma folha axênica de citros, com formação de apressório (Figura 29 B).

4.6.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

Após 10 da inoculação pode-se observar uma grande quantidade de conídios do isolado EC145 em uma lesão produzida pelo mesmo. A Figura 30 mostra a forma destes esporos. A Figura 31 mostra algumas poucas hifas encontradas no interior do tecido foliar após cortes transversais do mesmo, e tratamento com proteinase K. Este tratamento retirou o citoplasma das células das folhas de citros, permitindo a visualização de hifas do fungo que cresceram no interior das mesmas. Apesar da grande quantidade de esporos mostrada na Figura 30, poucas hifas foram encontradas. Isto pode ser decorrente do curto tempo de incubação, ou pode indicar que este fungo tem crescimento restrito a regiões mais próximas a superfície foliar.

A **B**

Figura 29: Germinação de conídios do isolado EC145 de *G. citricarpa*, na superfície foliar de citros, com 48 horas de incubação. A) Conídios na superfície de um estômato (seta). B) Germinação com formação de apressório (seta).

A **B**

Figura 30: Microscopia eletrônica de varredura de conídios do isolado EC145 em lesões em folhas de citros, após 10 dias da inoculação. A) Aumento de 500 x. Barra: 5 µm. B) Aumento de 3000 x. Barra: 2 µm.

A

B

Figura 31: Microscopia eletrônica de varredura, mostrando hifas (setas) no interior de células de laranjeira tratadas com Proteinase K.. A) Aumento de 2.000 x. Barra: 5 μ m B) Aumento de 5.000 x. Barra: 20 μ m

4.7. Extração e Purificação de Exopolissacarídios

Como apresentado no item 4.2, quando o fungo *G. citricarpa* crescia em meio líquido, era observada a produção de uma polissacarídio, que reduzia a solubilidade do DNA em TE, no momento de sua purificação. Esta observação serviu de base para a investigação da produção de exopolissacarídios por isolados de *G. citricarpa*.

Por meio de análises em Cromatografia Gasosa, foi possível observar a presença de um heteropolissacarídio composto de glicose, manose, galactose e arabinose. Diferenças na composição percentual dos monossacarídios constituintes foram observadas, sendo dependentes da fonte de carbono e do pH do meio de cultura, bem como dos isolados estudados na mesmas condições. Como pode ser observado na Tabela 16, a produção de polissacarídios pelo isolado ECPR8 foi maior entre os pHs 5,5 e 9,5. Comparando-se a produção de polissacarídio pelos isolados EC145 e ECPR8 nos dois meios de cultura, sacarose e glicose, em pH 5,5, percebe-se que o isolado EC145 produziu uma quantidade superior, mesmo com uma quantidade de inóculo inferior que o PR8 (Tabela 17). Parece também, que utilizando-se sacarose como fonte de carbono, é possível reduzir-se a quantidade de exopolissacarídios produzida por estes isolados de *G. citricarpa*.

Tabela 16: Produção de exopolissacarídios (EPS) pelo isolado ECPR8 com 5 dias de crescimento em 150 ml de meio contendo glicose como fonte de carbono, em diferentes pHs. O inóculo inicial foi de $1,4 \times 10^5$ esporos/ml.

pH	PRODUÇÃO DE EPS (em mg)
3,5	19,1
5,5	24,5
7,5	28,1
9,5	25,8

Tabela 17: Efeitos da fonte de carbono na produção de exopolissacarídios pelos isolados ECPR8 e EC145, com 5 dias de crescimento em 1.000 ml de meio de cultura, pH 5,5.

ISOLADO	FONTE DE CARBONO	INÓCULO (esporos/ml)	PRODUÇÃO DE EPS (em mg)
PR8	GLICOSE	$1,4 \times 10^5$	86,6
PR8	SACAROSE	$1,4 \times 10^5$	61,6
145	GLICOSE	$3,0 \times 10^4$	186
145	SACAROSE	$3,0 \times 10^4$	163

A Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética do carbono 13 do polissacarídio, revelou a presença de α -L-Araf, α -D-Glcp, α -D-Manp e β -D-Galp como indicado pelos sinais característicos observados nas regiões anoméricas δ 109.2, 108.8 e 108.2 para α -L-arabinofuranosil; δ 100.1 para α -D-glucopyranosil; δ 101.7 para α -D-manopyranosil e δ 103.4 para α -D-galactopyranosil.

A Tabela 18 mostra a porcentagem de cada monossacarídio produzida pelos isolados EC145 e ECPR8 em diferentes meios de cultura e pHs. Percebe-se que há variação tanto em função do isolado, do meio de cultura e do pH do meio de cultura utilizado. Assim, o isolado ECPR8 produz mais glicose em pH 3,5 enquanto em pH 5,5, produz maior quantidade de Manose. Por outro lado, quando variou-se a fonte de carbono do meio de cultura, fixando-se o pH em 5,5, houve maior produção de Glicose no meio sacarose, e maior produção de Manose em meio glicose.

Tabela 18: Porcentagem dos monossacarídios produzidos pelos isolados ECPR8 e EC145, com 5 dias de crescimento em diferentes condições.

ISOLADO	pH	FONTE DE CARBONO	GLICOSE (%)	GALACTOSE (%)	MANOSE (%)	ARABINOSE (%)
PR8	3,5	GLICOSE	52,75	19,96	24,94	2,35
PR8	5,5	GLICOSE	7,84	0,22	78,85	13,09
PR8	5,5	SACAROSE	46,61	22,41	30,14	0,84
PR8	7,5	GLICOSE	46,61	32,60	19,80	0,99
PR8	9,5	GLICOSE	39,57	29,83	6,30	24,30
145	5,5	GLICOSE	66,78	15,87	23,11	0,24
145	5,5	SACAROSE	44,24	9,38	21,22	25,16

Para o isolado EC145, a variação quanto a produção de glicose foi inferior, porém, a de arabinose mostrou-se praticamente dependente do meio sacarose. O estudo de tais variações é importante, uma vez que a produção de polissacarídeos dificulta algumas metodologias aplicadas a este fungo. Assim, a escolha da fonte de carbono do meio, bem como do pH, pode ser decisiva em determinadas condições de estudado.

Até o momento, foi caracterizada apenas uma molécula produzida pelo isolado EC145, uma Glucana β -1,6. Essa produção de exopolissacarídeos por *G. citricarpa* não havia sido relatada na literatura até o momento, mas pode estar relacionada com a mucilagem na qual os conídios são embebidos. Esta hipótese é reforçada por ter-se encontrado uma β (1-6) glucana, que segundo Gooday (1995) além de ser constituinte normal da parede celular, também é encontrada em mucilagens produzidas por ascomicetos. Em outros patógenos, acredita-se que esta mucilagem favoreça a adesão dos esporos na superfície dos hospedeiros (Hamer et al., 1988; Shaw et al., 1998). Para fungos cuja germinação é dependente da adesão, esta é, segundo Nicholson & Epstein (1991), considerada um fator de virulência para patogenicidade contribuindo para o desenvolvimento de doenças. Este parece que pode ser o caso de *G. citricarpa*. A descoberta de que a adesão é um pré-requisito para germinação, e o conhecimento de mecanismos que favoreçam tal adesão, pode ser vital para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da doença Mancha Preta dos Citros. Assim sendo, novos experimentos estão sendo conduzidos com o intuito de esclarecer o papel destes exopolissacarídeos em *G. citricarpa*.

4.8. Obtenção e Caracterização de Mutantes

4.8.1. Curva de Sobrevivência

Após exposição de uma solução de esporos do isolado EC145, a luz ultravioleta nos tempos 0, 30 segundos, 1, 2, 4, 8, 12, 16 e 20 minutos, obteve-se a curva de sobrevivência ilustrada na Figura 32.

Figura 32: Curva logarítmica obtida com as porcentagens de sobrevivência dos conídios do isolado EC145 a luz ultravioleta.

Observando a Figura 32 pode-se perceber que o tempo de exposição a luz ultravioleta ideal para obter-se 5% de sobrevivência é de 12 minutos. Sendo assim, este foi o tempo escolhido para a obtenção de mutantes. Este tempo, quando comparado aos 45 segundos utilizados para o fungo *Aspergillus nidulans* nas mesmas condições, revela uma alta resistência dos conídios de *G. citricarpa* a ação da luz ultravioleta. Tal resistência pode ser decorrente da ação de 3 fatores. *Guignardia citricarpa* possui conídios multinucleados (Glienke, 1995), isto confere ao fungo maior resistência a este mutagênico, e torna a obtenção de mutantes auxotróficos em uma tarefa árdua. Outra barreira encontrada em certos fungos patogênicos, é a presença de pigmentos semelhantes a melanina, tornando-os mais resistentes a exposição a luz ultravioleta (Durrell, 1964; Gooday, 1995). Este parece ser o caso de *G. citricarpa*. Um terceiro fator

a ser considerado, é a presença de mucilagem envolvendo os conídios deste fungo. Tal mucilagem poderia diminuir a incidência da luz ultravioleta sobre os conídios.

A Figura 32 chama atenção pela maior taxa de sobrevivência dos conídios, em baixas doses de exposição a luz U.V. Tal observação repetiu-se constantemente e pode ser decorrente de 3 fatores, segundo Griffin (1984). Primeiro, curvas lineares são observadas geralmente quando esporos uninucleados são tratados, o mesmo não acontecendo com esporos multinucleados. Segundo, quando baixas doses do agente mutagênico são utilizadas, pode ocorrer reparo de algumas mutações por mecanismos não dependentes de luz branca. O terceiro e mais provável, segundo o autor, é que baixas doses de luz U.V. podem estimular a germinação dos conídios.

4.8.2. Obtenção de Mutantes

O isolado EC145 foi irradiado, inoculado em meio mínimo (MM) líquido e deixado para crescer por 22 horas e filtrado em seringa com lã de vidro. Assim, os conídios prototróficos germinaram em meio mínimo e foram retidos na lã de vidro, passando apenas para a solução, os conídios auxotróficos. De uma solução inicial de 5×10^5 conídios/ml, obteve-se 750 colônias em meio completo (MC). Estas colônias foram transferidas para placas com meio mínimo em 26 pontos, sendo que 23 delas não cresceram, sendo portanto classificadas como auxotróficas. Estes possíveis mutantes foram então purificados (item 3.14) e então repicados novamente em meio mínimo. Esta purificação foi realizada, uma vez que os esporos de *G. citricarpa* são na maioria bi e trinucleados (Glienke, 1995).

Os resultados do teste de caracterização das 23 colônias restantes, estão resumidos na Tabela 19.

Tabela 19: Caracterização dos 23 mutantes auxotróficos selecionados.

Quantidade	Aminoácidos	Vitaminas	Ácidos Nucleicos	Meio Mínimo
36	+	+	+	+
5	+	-	-	-
5 revertentes				

4	-	+	-	-
		1 Tiamina		
		3 revertentes		
2	-	-	+	-
			2 Adenina	

Nos testes de auxonografia seguintes, para identificar a vitamina, ácido nucleico ou aminoácido requerido para cada um dos 11 mutantes, 8 cresceram em Meio Mínimo, sendo considerados revertentes, 1 cresceu apenas em Tiamina e 2 em Adenina (Tabela 19), porém reverteram posteriormente. A baixa taxa de obtenção de mutantes auxotróficos, deve ser decorrente do fato de *G. citricarpa* possuir esporos multinucleados (Glienke, 1985). Esta talvez também seja a explicação para a alta taxa de reversão dos mutantes, pois se um único núcleo não mutado estiver presente, este pode formar um setor prototrófico e assim resultar em uma aparente reversão. Esta instabilidade tentou-se reduzir com as purificações, porém parece que não foi eficiente. Uma alternativa para tentar-se reduzir esta instabilidade e conseqüente a taxa de reversão, talvez seja a purificação sugerida por Clutterbuck (1994) onde as hifas são fragmentadas e então inoculadas. Outra alternativa possível, é a utilização de outros agentes mutagênicos. Neste momento, estão sendo realizadas curvas de sobrevivência ao ácido nitroso.

Foi obtido também pela exposição a luz ultravioleta, um mutante morfológico para pigmentação (Figura 33). Este mutante albino (145.92.1) apresentou-se estável (sem setores revertentes) e estéril. Tal esterilidade já foi demonstrada em mutantes albinos de *Cochliobolus carbonum* (Leonard, 1972) e *Ophiostoma piliferum* (Zimmerman et al., 1995) indicando que a produção de melanina pode ter especial papel tanto no processo de infecção como no desenvolvimento do fungo (Bell & Wheeler, 1986; Zimmerman et al., 1995; Dean, 1997).

A **B** **C**

Figura 33: Caracterização do Mutante albino 145.91.2., quanto a via de biossíntese da Melanina
A) Mutante inoculado em meio MC adicionado de extrato do fungo selvagem EC145.
B) Mutante inoculado juntamente com a linhagem selvagem EC145. C) Reverso da colônia apresentada em B.

A Figura 33 mostra a tentativa de caracterização deste mutante, quanto a via de biossíntese da melanina. O M145.92.1, permaneceu albino e estéril, mesmo quando crescido em meio MC que contém Tirosina. Segundo Cooper & Gadd (1984), esta não restauração do pigmento sugere que a via de biossíntese de melanina neste fungo não é via oxidação da tirosina, o que está de acordo com a maioria dos Ascomicetos.

Em outros dois experimentos, onde o M 145.91.2 foi inoculado em meio contendo extrato do fungo selvagem (Figura 33A) ou juntamente com este na mesma placa (Figura 33 B e C), não houve igualmente produção da pigmentação, nem de esporos. A reversão temporária da pigmentação e da conidiação era esperada se a mutação existente impedisse a síntese de algum precursor da melanina (Zimmerman et al., 1995). Este resultado negativo, pode sugerir que tal mutação esteja impedindo a síntese de uma enzima de atuação tardia na via, ou que a melanina em *G. citricarpa* não seja a DHN. Para confirmar tais resultados e caracterizar a via de biossíntese da melanina em *G. citricarpa*, experimentos futuros compreenderão a suplementação do meio de cultura deste fungo, com catecol, scitalone ou ácido shiquímico, conforme Cooper & Gadd (1984), Bell & Wheeler (1986) e Dean (1997).

De qualquer forma, este mutante de *G. citricarpa* possibilita estudos voltados não apenas para o desenvolvimento desta espécie, como também poderá ser utilizado em estudos futuros sobre a patogenicidade. Tal mutante poderá contribuir para o esclarecimento da produção de melanina em *G. citricarpa* e consequentemente do processo de infecção no hospedeiro, como ocorreu em *Pyricularia oryzae*, *Colletotrichum lagenarium* e *C. lindemuthianum* entre outros (Bell & Wheeler, 1986).

4.9. Transformação Genética

No teste de resistência a higromicina B, os isolados EC145, ECPR3, PC13, PC18 e PC97013 mostraram-se sensíveis a baixas concentrações de higromicina, não crescendo em placas com 100 µg/ml deste antibiótico. Entretanto, o isolado ECPR8 apresentou resistência parcial a 100 µg/ml e total inibição de crescimento a partir de

concentrações de higromicina de 200 µg/ml. Assim, 200 µg/ml de Higromicina B foram utilizadas como agente seletivo para o desenvolvimento do sistema de transformação de *G. citricarpa*.

4.9.1. Transformação de protoplastos

Os isolados PC18 e ECPR3 foram inicialmente utilizados para transformação por esta metodologia. A eficiência de protoplastização foi baixa, resultando apenas em 5×10^6 protoplastos de cada isolado, partindo-se de 500 ml de cultura. Além disso, a taxa de regeneração dos protoplastos foi de 0 para o isolado PC18 e 0,3% para o isolado ECPR3, não sendo obtido nenhum transformante estável.

4.9.2. Transformação de Células Intactas

O isolado ECPR8 foi escolhido para transformação com auxílio do Acetato de Lítio, uma vez que este foi o isolado com melhor taxa de germinação observada (item 4.6.3) e melhor taxa de esporulação entre os isolados endofíticos de *G. citricarpa* ensaiados. Nesta metodologia, utilizou-se a germinação dos conídios em substrato a base de polistireno, por observar-se que a taxa de germinação era superior aquela encontrada em meio líquido. Foram obtidos 40 prováveis transformantes resistentes a higromicina B, resultando em uma taxa de 7 transformantes/µg de vetor.

4.9.3. Estabilidade Mitótica dos Transformantes

Os 40 prováveis transformantes foram ensaiados quanto a estabilidade mitótica, sendo que 7 apresentaram-se estáveis após 5 repiques alternando entre meio seletivo e não seletivo.

4.9.4. Análise dos Transformantes via PCR

Os 7 prováveis transformantes estáveis foram testados quanto a presença do gene *hph* por amplificação via PCR. A Figura 34 mostra a amplificação do fragmento de 462 pb esperado para os transformantes, porém pode-se observar esta banda também em 19 isolados de *Guignardia* spp não transformados, mesmo quando a temperatura de

anelamento utilizada foi de 67°C. Este resultado deve-se provavelmente em função do “primer” estar anelando em uma região complementar, cuja sequência interna possui o mesmo tamanho. Em função deste resultado, não é possível no momento, afirmar que as sete colônias obtidas sejam realmente transformantes, apesar de crescerem em até 400 µg/ml de Higromicina, enquanto os controles não crescem em apenas 100 µg/ml de Higromicina. Para poder fazer a distinção entre transformantes e não transformantes, novos “primers” deverão ser sintetizados, capazes de amplificar uma região mais interna do gene *hph*.

Figura 34: Reação de amplificação de 7 prováveis transformantes e 19 isolados não transformados (controles negativos), com os “primers” *hph1* e *hph2*, para amplificação de um fragmento de 462 pb do gene *hph*. M: marcador de peso molecular, DNA “Ladder” de 100pb. pCNS43: Plasmídeo contendo o gene *hph*, que confere resistência a higromicina B.

De qualquer forma, as baixas taxas de possíveis transformantes observadas em *G. citricarpa* estão de acordo com muitos fungos fitopatogênicos, e segundo Kwon-Chung (1998), esta dificuldade é independente da metodologia utilizada, seja transformando protoplastos ou células intactas. Porém a transformação de células intactas utilizando a combinação de PEG e acetato de lítio tem-se mostrado mais eficiente para aqueles fitopatógenos que apresentam dificuldade na obtenção ou regeneração dos protoplastos especialmente pela rigidez da parede celular em parte causada pela presença de melanina (Dhawale et al., 1984; Dean, 1997; Dantas-Barbosa et al., 1998). Este também é o caso de *G. citricarpa*. Uma dificuldade adicional nesta espécie, é a presença de esporos multinucleados (Gliénke, 1995), resultando na presença de núcleos não transformados compartilhando o mesmo citoplasma com núcleos transformados. Como resultado, tem-se setores transformados que devem ser purificados daqueles não transformados, e que cresceram em função da degradação da higromicina B pela ação dos genes higromicina B fosfotransferases presentes naqueles transformados.

5. CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos, conclui-se que:

- Existem pelo menos duas populações geneticamente diferentes de *G. citricarpa*, coexistindo de forma endofítica com linhagens patogênicas deste fungo, podendo ser isolados de lesão de MPC, sem no entanto causarem sintomas de doença nas plantas cítricas. Estes isolados endofíticos podem inclusive pertencer a outra espécie, pois são geneticamente semelhantes a linhagens patogênicas de *G. psidii*;
- Os três grupos principais de isolados de *Guignardia* spp podem ser distinguidos também pelo tipo de esporulação *in vitro*, mas não pela sua taxa de crescimento *in vitro*;
- Os isolados patogênicos de *G. citricarpa* podem ser diferenciados dos demais, também por meio de PCR utilizando-se o par de “primers” GCP obtido neste trabalho;
- O fungo *G. citricarpa* possui pelo menos 8 cromossomos e genoma de 21,5 Mb, não sendo encontrada variabilidade entre os isolados quanto a presença de minicromossomos;
- O fungo *G. citricarpa* possui alta instabilidade com freqüente formação de setores. Há dificuldade de obtenção de mutantes auxotróficos utilizando-se a luz ultra-violeta

como agente mutagênico. Entretanto, foi obtido um mutante albino que será muito útil no estudo fisiológico de *G. citricarpa*;

- Os isolados endofíticos EC145 e ECPR8 de *G. citricarpa* produzem exopolissacarídios em meio líquido, cuja excreção é dependente do pH e fonte de carbono utilizada no meio de cultura. Um dos exopolissacarídios produzidos pelo isolado EC145 é uma Glucana β -1,6 que pode estar relacionada com a adesão do conídio na superfície vegetal e conseqüentemente, com a infecção no hospedeiro;
- Um possível sistema de transformação genética de *G. citricarpa* foi obtido, tratando-se esporos em fase de germinação com Acetato de Lítio e PEG.

**ANEXO A: MATRIZ DE SIMILARIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS DE
Guignardia spp OBTIDA COM O COEFICIENTE DE JACCARD, A
PARTIR DOS DADOS DE RAPD.**

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1.000							
2	0.962	1.000						
3	0.962	1.000	1.000					
4	0.942	0.981	0.981	1.000				
5	0.705	0.710	0.710	0.694	1.000			
6	0.975	1.000	1.000	1.000	0.688	1.000		
7	0.942	0.981	0.981	1.000	0.694	1.000	1.000	
8	0.942	0.981	0.981	1.000	0.694	1.000	1.000	1.000
9	0.875	0.911	0.911	0.893	0.677	0.929	0.893	0.893
10	0.885	0.923	0.923	0.941	0.645	0.925	0.941	0.941
11	0.962	0.962	0.962	0.943	0.683	0.976	0.943	0.943
12	0.961	0.962	0.962	0.942	0.705	0.950	0.942	0.942
13	0.925	0.962	0.962	0.943	0.683	0.951	0.943	0.943
14	0.942	0.981	0.981	1.000	0.694	1.000	1.000	1.000
15	0.556	0.526	0.526	0.526	0.318	0.526	0.526	0.526
16	0.943	0.981	0.981	0.962	0.698	0.976	0.962	0.962
17	0.650	0.619	0.619	0.619	0.417	0.619	0.619	0.619
18	0.619	0.667	0.667	0.667	0.400	0.667	0.667	0.667
19	0.803	0.836	0.836	0.820	0.869	0.830	0.820	0.820
20	0.961	0.962	0.962	0.942	0.733	0.950	0.942	0.942
21	0.904	0.906	0.906	0.887	0.635	0.902	0.887	0.887
22	0.233	0.246	0.246	0.250	0.179	0.375	0.250	0.250
23	0.131	0.141	0.141	0.143	0.165	0.136	0.143	0.143
24	0.904	0.942	0.942	0.923	0.661	0.950	0.923	0.923
25	0.830	0.868	0.868	0.885	0.603	0.950	0.885	0.885
26	0.904	0.942	0.942	0.961	0.661	0.975	0.961	0.961
27	0.096	0.107	0.107	0.108	0.118	0.131	0.108	0.108
28	0.904	0.942	0.942	0.961	0.661	0.975	0.961	0.961
29	0.904	0.942	0.942	0.961	0.661	0.975	0.961	0.961
30	0.788	0.827	0.827	0.808	0.590	0.800	0.808	0.808
31	0.152	0.148	0.148	0.150	0.159	0.145	0.150	0.150
32	0.152	0.148	0.148	0.150	0.173	0.145	0.150	0.150
33	0.152	0.148	0.148	0.150	0.173	0.145	0.150	0.150
34	0.165	0.160	0.160	0.163	0.185	0.161	0.163	0.163
35	0.165	0.160	0.160	0.163	0.185	0.145	0.163	0.163
36	0.143	0.139	0.139	0.141	0.165	0.133	0.141	0.141
37	0.152	0.148	0.148	0.150	0.173	0.129	0.150	0.150
38	0.182	0.177	0.177	0.179	0.188	0.183	0.179	0.179
39	0.152	0.148	0.148	0.150	0.173	0.145	0.150	0.150
40	0.154	0.150	0.150	0.152	0.175	0.148	0.152	0.152
41	0.115	0.112	0.112	0.114	0.122	0.114	0.114	0.114
42	0.123	0.120	0.120	0.122	0.130	0.125	0.122	0.122
43	0.103	0.114	0.114	0.115	0.111	0.116	0.115	0.115
44	0.098	0.095	0.095	0.096	0.093	0.123	0.096	0.096
45	0.118	0.115	0.115	0.116	0.125	0.134	0.116	0.116
46	0.118	0.115	0.115	0.116	0.125	0.134	0.116	0.116
47	0.103	0.114	0.114	0.115	0.111	0.116	0.115	0.115
48	0.108	0.106	0.106	0.107	0.103	0.123	0.107	0.107
48B	0.147	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143
49	0.112	0.110	0.110	0.111	0.108	0.129	0.111	0.111
50	0.093	0.091	0.091	0.092	0.101	0.103	0.092	0.092
51	0.094	0.092	0.092	0.093	0.102	0.119	0.093	0.093
52	0.114	0.124	0.124	0.125	0.133	0.118	0.125	0.125
53	0.084	0.082	0.082	0.083	0.080	0.108	0.083	0.083
54	0.091	0.101	0.101	0.102	0.111	0.104	0.102	0.102
55	0.122	0.133	0.133	0.135	0.128	0.145	0.135	0.135
56	0.118	0.114	0.114	0.116	0.116	0.137	0.116	0.116
57	0.101	0.099	0.099	0.100	0.100	0.115	0.100	0.100
58	0.105	0.102	0.102	0.103	0.100	0.132	0.103	0.103
59	0.075	0.100	0.100	0.103	0.116	0.136	0.103	0.103
60	0.059	0.057	0.057	0.058	0.068	0.077	0.058	0.058
61	0.088	0.086	0.086	0.086	0.118	0.086	0.086	0.086
62	0.102	0.100	0.100	0.101	0.098	0.130	0.101	0.101
63	0.118	0.114	0.114	0.114	0.147	0.114	0.114	0.114
64	0.092	0.090	0.090	0.091	0.088	0.113	0.091	0.091
65	0.056	0.083	0.083	0.086	0.075	0.105	0.086	0.086
66	0.098	0.096	0.096	0.097	0.094	0.123	0.097	0.097
67	0.091	0.089	0.089	0.090	0.087	0.110	0.090	0.090
68	0.105	0.102	0.102	0.103	0.100	0.130	0.103	0.103
69	0.100	0.098	0.098	0.099	0.096	0.125	0.099	0.099
70	0.086	0.084	0.084	0.085	0.094	0.107	0.085	0.085
71	0.089	0.087	0.087	0.088	0.097	0.110	0.088	0.088
72	0.105	0.103	0.103	0.104	0.099	0.136	0.104	0.104
73	0.087	0.085	0.085	0.086	0.095	0.111	0.086	0.086
74	0.089	0.087	0.087	0.088	0.097	0.108	0.088	0.088
75	0.096	0.105	0.105	0.106	0.115	0.107	0.106	0.106
76	0.079	0.077	0.077	0.078	0.087	0.096	0.078	0.078
77	0.085	0.104	0.104	0.106	0.102	0.125	0.106	0.106
78	0.105	0.102	0.102	0.103	0.112	0.132	0.103	0.103
79	0.090	0.088	0.088	0.089	0.098	0.111	0.089	0.089
80	0.123	0.122	0.122	0.122	0.135	0.122	0.122	0.122
81	0.103	0.101	0.101	0.102	0.099	0.130	0.102	0.102
82	0.080	0.079	0.079	0.080	0.077	0.101	0.080	0.080
83	0.111	0.109	0.109	0.110	0.106	0.139	0.110	0.110
84	0.115	0.112	0.112	0.114	0.110	0.130	0.114	0.114
85	0.092	0.090	0.090	0.091	0.088	0.116	0.091	0.091
86	0.787	0.830	0.830	0.809	0.589	0.824	0.809	0.809
87	0.100	0.097	0.097	0.099	0.093	0.130	0.099	0.099
88	0.102	0.100	0.100	0.101	0.110	0.127	0.101	0.101
89	0.087	0.085	0.085	0.086	0.071	0.109	0.086	0.086
90	0.084	0.082	0.082	0.083	0.093	0.090	0.083	0.083
91	0.079	0.077	0.077	0.078	0.075	0.099	0.078	0.078
92	0.092	0.102	0.102	0.103	0.125	0.100	0.103	0.103
93	0.112	0.122	0.122	0.124	0.120	0.118	0.124	0.124
94	0.103	0.101	0.101	0.102	0.099	0.114	0.102	0.102
95	0.077	0.075	0.075	0.076	0.097	0.096	0.076	0.076
96	0.090	0.088	0.088	0.089	0.098	0.111	0.089	0.089
97	0.102	0.100	0.100	0.101	0.110	0.113	0.101	0.101
98	0.090	0.088	0.088	0.089	0.086	0.113	0.089	0.089
99	0.089	0.099	0.099	0.100	0.109	0.096	0.100	0.100
100	0.074	0.071	0.071	0.072	0.071	0.100	0.072	0.072
101	0.082	0.080	0.080	0.081	0.081	0.093	0.081	0.081
102	0.087	0.085	0.085	0.086	0.083	0.110	0.086	0.086
103	0.100	0.098	0.098	0.099	0.096	0.113	0.099	0.099

Continuação.....

	9	10	11	12	13	14	15	16
9	1.000							
10	0.839	1.000						
11	0.877	0.887	1.000					
12	0.875	0.922	0.925	1.000				
13	0.877	0.887	0.926	0.925	1.000			
14	0.893	0.941	0.943	0.942	0.943	1.000		
15	0.526	0.526	0.579	0.556	0.526	0.526	1.000	
16	0.895	0.906	0.944	0.943	0.944	0.962	0.500	1.000
17	0.619	0.619	0.667	0.650	0.619	0.619	0.923	0.591
18	0.667	0.667	0.714	0.619	0.667	0.667	0.733	0.636
19	0.769	0.770	0.806	0.803	0.806	0.820	0.375	0.823
20	0.875	0.885	0.925	0.961	0.925	0.942	0.588	0.943
21	0.857	0.830	0.906	0.868	0.870	0.887	0.556	0.889
22	0.254	0.259	0.267	0.233	0.226	0.250	0.588	0.242
23	0.163	0.148	0.141	0.145	0.128	0.143	0.182	0.140
24	0.857	0.865	0.906	0.904	0.906	0.923	0.556	0.925
25	0.789	0.863	0.833	0.830	0.833	0.885	0.526	0.852
26	0.857	0.902	0.906	0.904	0.906	0.961	0.526	0.925
27	0.116	0.113	0.107	0.110	0.094	0.108	0.238	0.106
28	0.857	0.902	0.906	0.904	0.906	0.961	0.526	0.925
29	0.857	0.902	0.906	0.904	0.906	0.961	0.526	0.925
30	0.750	0.820	0.792	0.824	0.792	0.808	0.625	0.811
31	0.143	0.141	0.163	0.152	0.148	0.150	0.125	0.160
32	0.143	0.141	0.163	0.152	0.148	0.150	0.125	0.160
33	0.143	0.141	0.163	0.152	0.148	0.150	0.125	0.160
34	0.155	0.139	0.175	0.150	0.160	0.163	0.125	0.173
35	0.155	0.139	0.175	0.150	0.160	0.163	0.125	0.173
36	0.134	0.132	0.154	0.128	0.139	0.141	0.125	0.152
37	0.143	0.141	0.163	0.152	0.148	0.150	0.125	0.160
38	0.171	0.171	0.192	0.167	0.163	0.179	0.167	0.190
39	0.143	0.127	0.163	0.138	0.148	0.150	0.125	0.160
40	0.145	0.143	0.165	0.154	0.150	0.152	0.125	0.163
41	0.133	0.118	0.125	0.115	0.100	0.114	0.160	0.111
42	0.145	0.125	0.135	0.123	0.105	0.122	0.167	0.118
43	0.122	0.119	0.114	0.116	0.101	0.115	0.174	0.112
44	0.118	0.100	0.095	0.098	0.082	0.096	0.160	0.107
45	0.136	0.120	0.128	0.118	0.102	0.116	0.200	0.114
46	0.136	0.120	0.128	0.118	0.102	0.116	0.192	0.114
47	0.135	0.119	0.101	0.116	0.101	0.115	0.200	0.112
48	0.128	0.111	0.106	0.108	0.093	0.107	0.167	0.105
48B	0.176	0.143	0.139	0.147	0.143	0.143	0.160	0.139
49	0.130	0.115	0.122	0.112	0.098	0.111	0.160	0.109
50	0.112	0.095	0.091	0.093	0.079	0.092	0.125	0.090
51	0.114	0.096	0.105	0.094	0.080	0.093	0.160	0.091
52	0.157	0.129	0.124	0.126	0.111	0.125	0.167	0.122
53	0.092	0.086	0.082	0.084	0.070	0.083	0.125	0.081
54	0.135	0.106	0.101	0.103	0.089	0.102	0.167	0.100
55	0.158	0.139	0.133	0.137	0.118	0.135	0.200	0.132
56	0.125	0.121	0.116	0.118	0.099	0.116	0.222	0.114
57	0.110	0.104	0.100	0.101	0.083	0.100	0.111	0.099
58	0.124	0.107	0.115	0.105	0.090	0.103	0.200	0.101
59	0.122	0.103	0.100	0.100	0.100	0.103	0.235	0.098
60	0.067	0.060	0.070	0.059	0.070	0.058	0.174	0.069
61	0.086	0.086	0.083	0.088	0.086	0.086	0.182	0.114
62	0.121	0.105	0.112	0.102	0.088	0.101	0.208	0.099
63	0.147	0.114	0.111	0.118	0.114	0.114	0.130	0.111
64	0.111	0.094	0.090	0.092	0.078	0.091	0.208	0.089
65	0.079	0.086	0.083	0.083	0.083	0.086	0.200	0.081
66	0.116	0.100	0.108	0.098	0.084	0.097	0.160	0.095
67	0.110	0.093	0.089	0.091	0.077	0.090	0.160	0.088
68	0.124	0.107	0.102	0.105	0.090	0.103	0.167	0.101
69	0.118	0.102	0.110	0.100	0.086	0.099	0.200	0.097
70	0.104	0.088	0.096	0.086	0.073	0.085	0.160	0.083
71	0.108	0.091	0.087	0.089	0.075	0.088	0.120	0.086
72	0.127	0.107	0.117	0.105	0.089	0.104	0.240	0.101
73	0.105	0.089	0.085	0.087	0.074	0.086	0.120	0.084
74	0.108	0.091	0.087	0.089	0.075	0.088	0.120	0.086
75	0.125	0.110	0.105	0.108	0.094	0.106	0.160	0.104
76	0.098	0.080	0.089	0.079	0.065	0.078	0.160	0.076
77	0.100	0.106	0.104	0.106	0.104	0.106	0.167	0.102
78	0.124	0.107	0.115	0.105	0.090	0.103	0.208	0.101
79	0.109	0.092	0.100	0.090	0.076	0.089	0.160	0.087
80	0.135	0.127	0.135	0.125	0.107	0.122	0.192	0.120
81	0.122	0.106	0.114	0.103	0.089	0.102	0.200	0.100
82	0.100	0.082	0.091	0.080	0.091	0.080	0.200	0.078
83	0.129	0.114	0.121	0.111	0.097	0.110	0.240	0.108
84	0.133	0.118	0.125	0.115	0.100	0.114	0.250	0.111
85	0.099	0.094	0.090	0.092	0.078	0.091	0.125	0.089
86	0.745	0.766	0.792	0.787	0.792	0.809	0.579	0.813
87	0.093	0.101	0.113	0.100	0.082	0.099	0.167	0.096
88	0.121	0.105	0.112	0.102	0.088	0.101	0.200	0.099
89	0.082	0.090	0.099	0.087	0.072	0.086	0.182	0.084
90	0.092	0.086	0.095	0.084	0.070	0.083	0.160	0.081
91	0.086	0.080	0.077	0.079	0.065	0.078	0.125	0.076
92	0.124	0.107	0.090	0.105	0.090	0.103	0.125	0.101
93	0.130	0.128	0.110	0.125	0.110	0.124	0.125	0.121
94	0.110	0.106	0.114	0.103	0.089	0.102	0.182	0.100
95	0.096	0.079	0.075	0.077	0.064	0.076	0.125	0.074
96	0.109	0.092	0.088	0.090	0.076	0.089	0.120	0.087
97	0.121	0.105	0.100	0.102	0.088	0.101	0.120	0.099
98	0.109	0.092	0.088	0.090	0.076	0.089	0.160	0.087
99	0.108	0.103	0.087	0.101	0.087	0.100	0.120	0.098
100	0.100	0.074	0.087	0.072	0.071	0.072	0.200	0.070
101	0.091	0.085	0.081	0.082	0.066	0.081	0.000	0.080
102	0.105	0.089	0.097	0.087	0.074	0.086	0.200	0.084
103	0.118	0.102	0.110	0.100	0.086	0.099	0.167	0.097

Continuação...

	17	18	19	20	21	22	23	24
17	1.000							
18	0.824	1.000						
19	0.462	0.500	1.000					
20	0.684	0.571	0.803	1.000				
21	0.650	0.700	0.758	0.868	1.000			
22	0.400	0.440	0.217	0.233	0.254	1.000		
23	0.133	0.129	0.141	0.145	0.133	0.233	1.000	
24	0.571	0.619	0.787	0.904	0.849	0.237	0.119	1.000
25	0.619	0.667	0.726	0.830	0.778	0.268	0.150	0.846
26	0.619	0.667	0.787	0.904	0.849	0.237	0.119	0.960
27	0.179	0.172	0.122	0.110	0.098	0.340	0.686	0.098
28	0.619	0.667	0.787	0.904	0.849	0.237	0.119	0.960
29	0.619	0.667	0.787	0.904	0.849	0.237	0.119	0.960
30	0.632	0.684	0.689	0.788	0.736	0.218	0.114	0.878
31	0.103	0.138	0.161	0.138	0.139	0.108	0.147	0.154
32	0.103	0.138	0.161	0.138	0.125	0.108	0.147	0.154
33	0.103	0.138	0.161	0.138	0.125	0.108	0.147	0.154
34	0.103	0.138	0.172	0.150	0.138	0.106	0.145	0.167
35	0.103	0.138	0.172	0.150	0.152	0.104	0.145	0.167
36	0.103	0.138	0.153	0.128	0.130	0.111	0.137	0.145
37	0.103	0.138	0.161	0.138	0.139	0.106	0.147	0.154
38	0.138	0.172	0.188	0.167	0.169	0.125	0.147	0.184
39	0.103	0.138	0.161	0.138	0.139	0.106	0.147	0.154
40	0.103	0.138	0.163	0.139	0.127	0.109	0.149	0.156
41	0.121	0.152	0.115	0.102	0.116	0.262	0.643	0.103
42	0.125	0.156	0.122	0.108	0.123	0.267	0.608	0.110
43	0.129	0.161	0.116	0.103	0.105	0.226	0.655	0.105
44	0.121	0.152	0.099	0.084	0.099	0.246	0.518	0.099
45	0.152	0.182	0.129	0.105	0.119	0.305	0.607	0.093
46	0.152	0.182	0.129	0.105	0.119	0.305	0.607	0.093
47	0.152	0.182	0.116	0.103	0.118	0.226	0.596	0.118
48	0.129	0.161	0.109	0.095	0.110	0.259	0.554	0.096
48B	0.125	0.156	0.158	0.118	0.147	0.206	0.739	0.147
49	0.121	0.152	0.112	0.100	0.114	0.258	0.649	0.089
50	0.097	0.129	0.095	0.080	0.094	0.250	0.618	0.081
51	0.121	0.152	0.096	0.081	0.095	0.271	0.630	0.082
52	0.133	0.167	0.125	0.114	0.115	0.258	0.661	0.102
53	0.097	0.129	0.087	0.071	0.085	0.246	0.545	0.085
54	0.133	0.167	0.104	0.091	0.092	0.262	0.596	0.092
55	0.156	0.188	0.134	0.122	0.122	0.305	0.627	0.123
56	0.125	0.188	0.122	0.101	0.119	0.279	0.605	0.103
57	0.056	0.111	0.107	0.086	0.103	0.302	0.568	0.087
58	0.152	0.182	0.105	0.092	0.106	0.288	0.607	0.093
59	0.190	0.190	0.114	0.100	0.075	0.286	0.516	0.103
60	0.133	0.167	0.075	0.047	0.072	0.259	0.441	0.047
61	0.133	0.129	0.105	0.091	0.121	0.182	0.520	0.088
62	0.152	0.182	0.103	0.090	0.103	0.305	0.643	0.091
63	0.094	0.125	0.132	0.088	0.118	0.143	0.696	0.118
64	0.143	0.171	0.094	0.080	0.106	0.246	0.579	0.093
65	0.167	0.167	0.073	0.083	0.056	0.212	0.500	0.086
66	0.111	0.139	0.099	0.086	0.099	0.250	0.655	0.087
67	0.111	0.139	0.093	0.079	0.092	0.206	0.625	0.092
68	0.114	0.143	0.105	0.092	0.106	0.250	0.607	0.093
69	0.143	0.171	0.101	0.088	0.101	0.254	0.679	0.089
70	0.108	0.135	0.088	0.074	0.087	0.227	0.684	0.075
71	0.083	0.111	0.091	0.077	0.090	0.219	0.661	0.078
72	0.167	0.194	0.106	0.091	0.105	0.258	0.647	0.107
73	0.086	0.114	0.089	0.075	0.088	0.231	0.638	0.076
74	0.081	0.108	0.091	0.077	0.090	0.219	0.632	0.078
75	0.108	0.135	0.108	0.096	0.097	0.239	0.661	0.097
76	0.114	0.143	0.082	0.067	0.080	0.226	0.685	0.080
77	0.143	0.179	0.113	0.085	0.085	0.214	0.500	0.109
78	0.143	0.171	0.105	0.092	0.106	0.267	0.579	0.093
79	0.111	0.139	0.092	0.078	0.091	0.242	0.614	0.079
80	0.135	0.162	0.141	0.110	0.125	0.226	0.696	0.110
81	0.143	0.171	0.104	0.091	0.105	0.283	0.625	0.092
82	0.139	0.167	0.083	0.068	0.081	0.254	0.508	0.069
83	0.167	0.194	0.111	0.099	0.112	0.270	0.638	0.100
84	0.171	0.200	0.115	0.102	0.116	0.290	0.586	0.103
85	0.088	0.118	0.094	0.080	0.093	0.246	0.636	0.080
86	0.500	0.542	0.709	0.787	0.787	0.258	0.135	0.804
87	0.133	0.167	0.101	0.085	0.100	0.291	0.604	0.086
88	0.143	0.171	0.103	0.090	0.103	0.258	0.643	0.091
89	0.138	0.172	0.078	0.074	0.089	0.241	0.547	0.089
90	0.129	0.161	0.087	0.071	0.085	0.250	0.545	0.085
91	0.083	0.111	0.082	0.067	0.080	0.262	0.569	0.067
92	0.091	0.088	0.105	0.105	0.093	0.206	0.607	0.093
93	0.094	0.125	0.124	0.112	0.114	0.254	0.649	0.101
94	0.121	0.152	0.104	0.091	0.105	0.246	0.625	0.080
95	0.086	0.083	0.080	0.077	0.078	0.219	0.661	0.066
96	0.083	0.111	0.092	0.078	0.091	0.222	0.643	0.079
97	0.086	0.114	0.103	0.090	0.103	0.222	0.643	0.079
98	0.121	0.152	0.092	0.078	0.091	0.242	0.559	0.079
99	0.083	0.111	0.102	0.089	0.090	0.222	0.603	0.102
100	0.152	0.182	0.080	0.058	0.075	0.277	0.581	0.074
101	0.000	0.056	0.089	0.068	0.083	0.261	0.600	0.068
102	0.143	0.171	0.089	0.075	0.088	0.290	0.583	0.076
103	0.118	0.147	0.101	0.088	0.101	0.254	0.649	0.077

Continuação...

	25	26	27	28	29	30	31	32
25	1.000							
26	0.882	1.000						
27	0.114	0.098	1.000					
28	0.882	1.000	0.098	1.000				
29	0.882	1.000	0.098	1.000	1.000			
30	0.765	0.840	0.105	0.840	0.840	1.000		
31	0.158	0.154	0.139	0.154	0.154	0.151	1.000	
32	0.158	0.154	0.139	0.154	0.154	0.151	0.952	1.000
33	0.158	0.154	0.139	0.154	0.154	0.151	0.907	0.952
34	0.171	0.167	0.137	0.167	0.167	0.149	0.930	0.976
35	0.156	0.167	0.137	0.167	0.167	0.149	0.930	0.930
36	0.164	0.145	0.145	0.145	0.145	0.141	0.795	0.795
37	0.143	0.154	0.139	0.154	0.154	0.151	0.952	0.952
38	0.205	0.184	0.155	0.184	0.184	0.183	0.822	0.783
39	0.158	0.154	0.139	0.154	0.154	0.135	0.952	0.952
40	0.160	0.156	0.141	0.156	0.156	0.153	0.929	0.976
41	0.093	0.103	0.600	0.103	0.103	0.098	0.100	0.100
42	0.097	0.110	0.580	0.110	0.110	0.103	0.111	0.111
43	0.107	0.105	0.642	0.105	0.105	0.099	0.087	0.087
44	0.115	0.099	0.528	0.099	0.099	0.092	0.110	0.110
45	0.122	0.093	0.623	0.093	0.093	0.086	0.117	0.117
46	0.122	0.093	0.623	0.093	0.093	0.086	0.132	0.132
47	0.120	0.118	0.554	0.118	0.118	0.113	0.087	0.087
48	0.127	0.096	0.537	0.096	0.096	0.090	0.092	0.092
48B	0.143	0.143	0.696	0.143	0.143	0.156	0.152	0.152
49	0.116	0.089	0.579	0.089	0.089	0.082	0.111	0.098
50	0.083	0.081	0.574	0.081	0.081	0.074	0.076	0.076
51	0.098	0.082	0.615	0.082	0.082	0.075	0.120	0.120
52	0.118	0.102	0.618	0.102	0.102	0.096	0.113	0.113
53	0.101	0.085	0.558	0.085	0.085	0.078	0.095	0.095
54	0.094	0.092	0.554	0.092	0.092	0.085	0.101	0.101
55	0.127	0.123	0.667	0.123	0.123	0.118	0.125	0.125
56	0.106	0.103	0.548	0.103	0.103	0.095	0.067	0.067
57	0.090	0.087	0.548	0.087	0.087	0.078	0.085	0.085
58	0.108	0.093	0.623	0.093	0.093	0.086	0.117	0.117
59	0.139	0.105	0.655	0.105	0.105	0.103	0.216	0.216
60	0.061	0.047	0.473	0.047	0.047	0.037	0.141	0.141
61	0.086	0.086	0.480	0.086	0.086	0.094	0.125	0.125
62	0.106	0.091	0.630	0.091	0.091	0.084	0.100	0.100
63	0.114	0.114	0.583	0.114	0.114	0.125	0.121	0.121
64	0.108	0.093	0.509	0.093	0.093	0.086	0.075	0.075
65	0.125	0.088	0.593	0.088	0.088	0.086	0.143	0.143
66	0.101	0.087	0.586	0.087	0.087	0.080	0.108	0.095
67	0.107	0.092	0.554	0.092	0.092	0.085	0.087	0.087
68	0.108	0.093	0.564	0.093	0.093	0.086	0.089	0.089
69	0.103	0.089	0.607	0.089	0.089	0.082	0.098	0.098
70	0.089	0.075	0.586	0.075	0.075	0.068	0.095	0.095
71	0.092	0.078	0.589	0.078	0.078	0.071	0.099	0.099
72	0.125	0.107	0.620	0.107	0.107	0.100	0.108	0.108
73	0.090	0.076	0.596	0.076	0.076	0.069	0.096	0.096
74	0.092	0.078	0.561	0.078	0.078	0.071	0.099	0.099
75	0.099	0.097	0.621	0.097	0.097	0.091	0.106	0.106
76	0.094	0.080	0.582	0.080	0.080	0.072	0.101	0.101
77	0.136	0.109	0.576	0.109	0.109	0.114	0.167	0.167
78	0.108	0.093	0.593	0.093	0.093	0.086	0.147	0.147
79	0.093	0.079	0.544	0.079	0.079	0.071	0.100	0.100
80	0.110	0.108	0.636	0.108	0.108	0.103	0.104	0.104
81	0.107	0.092	0.642	0.092	0.092	0.085	0.115	0.115
82	0.083	0.069	0.545	0.069	0.069	0.074	0.133	0.133
83	0.115	0.100	0.625	0.100	0.100	0.094	0.110	0.110
84	0.106	0.103	0.630	0.103	0.103	0.098	0.143	0.143
85	0.095	0.080	0.623	0.080	0.080	0.073	0.075	0.075
86	0.688	0.804	0.110	0.804	0.804	0.674	0.171	0.171
87	0.104	0.086	0.644	0.086	0.086	0.077	0.103	0.103
88	0.106	0.091	0.600	0.091	0.091	0.084	0.100	0.100
89	0.105	0.089	0.560	0.089	0.089	0.081	0.099	0.099
90	0.087	0.085	0.558	0.085	0.085	0.078	0.110	0.110
91	0.081	0.067	0.554	0.067	0.067	0.060	0.087	0.087
92	0.095	0.093	0.536	0.093	0.093	0.086	0.089	0.089
93	0.116	0.101	0.607	0.101	0.101	0.095	0.084	0.084
94	0.107	0.080	0.582	0.080	0.080	0.072	0.101	0.101
95	0.080	0.066	0.561	0.066	0.066	0.058	0.072	0.072
96	0.093	0.079	0.544	0.079	0.079	0.071	0.086	0.086
97	0.106	0.079	0.517	0.079	0.079	0.071	0.086	0.086
98	0.093	0.079	0.544	0.079	0.079	0.071	0.100	0.100
99	0.105	0.102	0.561	0.102	0.102	0.096	0.085	0.085
100	0.091	0.074	0.619	0.074	0.074	0.076	0.164	0.164
101	0.070	0.068	0.545	0.068	0.068	0.059	0.047	0.047
102	0.090	0.076	0.569	0.076	0.076	0.069	0.110	0.110
103	0.103	0.077	0.579	0.077	0.077	0.070	0.084	0.084

Continuação...

	33	34	35	36	37	38	39	40
33	1.000							
34	0.930	1.000						
35	0.886	0.953	1.000					
36	0.837	0.818	0.818	1.000				
37	0.907	0.930	0.976	0.795	1.000			
38	0.745	0.804	0.804	0.881	0.783	1.000		
39	0.907	0.976	0.976	0.837	0.952	0.822	1.000	
40	0.929	0.952	0.907	0.773	0.929	0.761	0.929	1.000
41	0.100	0.099	0.113	0.104	0.114	0.114	0.100	0.101
42	0.111	0.110	0.123	0.114	0.125	0.127	0.110	0.113
43	0.087	0.086	0.100	0.091	0.101	0.101	0.087	0.089
44	0.110	0.108	0.108	0.114	0.110	0.125	0.110	0.111
45	0.117	0.115	0.115	0.122	0.117	0.132	0.117	0.118
46	0.132	0.130	0.130	0.137	0.132	0.147	0.132	0.133
47	0.087	0.086	0.100	0.091	0.101	0.101	0.087	0.089
48	0.092	0.091	0.091	0.096	0.092	0.107	0.092	0.093
48B	0.152	0.152	0.152	0.152	0.152	0.147	0.152	0.152
49	0.098	0.096	0.096	0.101	0.098	0.125	0.098	0.099
50	0.076	0.075	0.089	0.079	0.090	0.090	0.076	0.077
51	0.120	0.118	0.118	0.125	0.120	0.135	0.120	0.122
52	0.113	0.111	0.125	0.117	0.127	0.127	0.113	0.114
53	0.095	0.093	0.093	0.099	0.095	0.110	0.095	0.096
54	0.101	0.100	0.114	0.105	0.115	0.115	0.101	0.103
55	0.125	0.123	0.137	0.129	0.139	0.141	0.123	0.127
56	0.067	0.066	0.083	0.070	0.085	0.103	0.067	0.068
57	0.085	0.083	0.102	0.089	0.103	0.103	0.085	0.086
58	0.117	0.115	0.115	0.122	0.117	0.132	0.117	0.118
59	0.216	0.216	0.211	0.216	0.211	0.216	0.216	0.216
60	0.141	0.139	0.139	0.147	0.141	0.141	0.141	0.143
61	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.121	0.125	0.125
62	0.100	0.099	0.099	0.104	0.100	0.114	0.100	0.101
63	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.118	0.121	0.121
64	0.075	0.074	0.074	0.078	0.075	0.089	0.075	0.076
65	0.143	0.143	0.139	0.143	0.139	0.143	0.143	0.143
66	0.095	0.094	0.094	0.099	0.095	0.122	0.095	0.096
67	0.087	0.086	0.086	0.091	0.087	0.101	0.087	0.089
68	0.089	0.087	0.087	0.092	0.089	0.103	0.089	0.090
69	0.098	0.096	0.096	0.101	0.098	0.111	0.098	0.099
70	0.095	0.094	0.094	0.099	0.095	0.108	0.095	0.096
71	0.099	0.098	0.098	0.103	0.099	0.113	0.099	0.100
72	0.108	0.107	0.105	0.111	0.107	0.139	0.107	0.110
73	0.096	0.095	0.095	0.100	0.096	0.110	0.096	0.098
74	0.099	0.098	0.098	0.103	0.099	0.113	0.099	0.100
75	0.106	0.105	0.118	0.110	0.119	0.119	0.106	0.107
76	0.101	0.100	0.100	0.105	0.101	0.115	0.101	0.103
77	0.167	0.167	0.163	0.167	0.163	0.163	0.167	0.167
78	0.147	0.145	0.145	0.153	0.147	0.162	0.147	0.149
79	0.100	0.099	0.099	0.104	0.100	0.114	0.100	0.101
80	0.104	0.103	0.104	0.109	0.106	0.121	0.104	0.106
81	0.115	0.114	0.114	0.120	0.115	0.130	0.115	0.117
82	0.133	0.132	0.132	0.139	0.133	0.133	0.133	0.135
83	0.110	0.108	0.108	0.114	0.110	0.138	0.110	0.111
84	0.143	0.141	0.156	0.149	0.158	0.158	0.143	0.145
85	0.075	0.074	0.074	0.078	0.075	0.089	0.075	0.076
86	0.171	0.186	0.200	0.176	0.186	0.206	0.186	0.174
87	0.103	0.101	0.100	0.106	0.101	0.119	0.101	0.104
88	0.100	0.099	0.099	0.104	0.100	0.128	0.100	0.101
89	0.099	0.097	0.097	0.103	0.099	0.114	0.099	0.100
90	0.110	0.108	0.123	0.114	0.125	0.125	0.110	0.111
91	0.087	0.086	0.086	0.091	0.087	0.101	0.087	0.089
92	0.089	0.087	0.101	0.092	0.103	0.103	0.089	0.090
93	0.084	0.083	0.096	0.087	0.098	0.098	0.084	0.085
94	0.101	0.100	0.100	0.105	0.101	0.115	0.101	0.103
95	0.072	0.071	0.071	0.075	0.072	0.085	0.072	0.073
96	0.086	0.085	0.085	0.090	0.086	0.100	0.086	0.087
97	0.086	0.085	0.085	0.090	0.086	0.100	0.086	0.087
98	0.100	0.099	0.099	0.104	0.100	0.114	0.100	0.101
99	0.085	0.084	0.098	0.089	0.099	0.099	0.085	0.086
100	0.164	0.164	0.164	0.167	0.164	0.161	0.167	0.164
101	0.047	0.046	0.063	0.049	0.063	0.063	0.047	0.048
102	0.110	0.108	0.108	0.114	0.110	0.123	0.110	0.111
103	0.084	0.083	0.083	0.087	0.084	0.098	0.084	0.085

Continuação...

	41	42	43	44	45	46	47	48
41	1.000							
42	0.977	1.000						
43	0.860	0.826	1.000					
44	0.706	0.681	0.623	1.000				
45	0.769	0.771	0.717	0.735	1.000			
46	0.769	0.771	0.717	0.700	0.957	1.000		
47	0.788	0.750	0.736	0.755	0.655	0.655	1.000	
48	0.712	0.688	0.630	0.822	0.740	0.740	0.760	1.000
48B	0.792	0.750	0.708	0.792	0.760	0.833	0.833	0.864
49	0.846	0.830	0.792	0.648	0.741	0.774	0.696	0.750
50	0.857	0.844	0.837	0.680	0.745	0.745	0.731	0.720
51	0.837	0.844	0.745	0.729	0.833	0.833	0.679	0.700
52	0.792	0.755	0.843	0.600	0.691	0.722	0.679	0.667
53	0.776	0.756	0.720	0.818	0.700	0.735	0.792	0.864
54	0.755	0.735	0.736	0.593	0.625	0.625	0.704	0.630
55	0.870	0.848	0.809	0.739	0.792	0.830	0.809	0.783
56	0.842	0.824	0.795	0.703	0.675	0.692	0.744	0.692
57	0.842	0.853	0.750	0.800	0.763	0.737	0.744	0.737
58	0.840	0.826	0.750	0.771	0.800	0.800	0.784	0.776
59	0.621	0.586	0.643	0.607	0.714	0.778	0.655	0.667
60	0.554	0.558	0.536	0.509	0.518	0.518	0.509	0.491
61	0.519	0.481	0.560	0.519	0.448	0.500	0.556	0.500
62	0.808	0.771	0.722	0.706	0.804	0.769	0.722	0.745
63	0.750	0.708	0.739	0.750	0.720	0.654	0.720	0.739
64	0.736	0.714	0.655	0.809	0.698	0.667	0.820	0.776
65	0.615	0.577	0.708	0.481	0.536	0.593	0.593	0.538
66	0.849	0.833	0.796	0.655	0.714	0.714	0.732	0.661
67	0.788	0.750	0.769	0.686	0.717	0.717	0.769	0.692
68	0.769	0.729	0.685	0.809	0.731	0.698	0.784	0.776
69	0.811	0.776	0.759	0.648	0.709	0.709	0.727	0.685
70	0.815	0.780	0.796	0.625	0.714	0.714	0.702	0.632
71	0.759	0.720	0.741	0.630	0.661	0.661	0.679	0.636
72	0.740	0.720	0.686	0.653	0.740	0.740	0.720	0.694
73	0.796	0.760	0.778	0.667	0.727	0.727	0.745	0.673
74	0.792	0.755	0.741	0.660	0.691	0.691	0.709	0.636
75	0.786	0.750	0.800	0.603	0.661	0.661	0.707	0.638
76	0.824	0.787	0.769	0.654	0.717	0.717	0.736	0.692
77	0.656	0.625	0.700	0.545	0.588	0.636	0.636	0.594
78	0.673	0.647	0.596	0.635	0.667	0.667	0.596	0.582
79	0.843	0.809	0.755	0.642	0.704	0.736	0.722	0.679
80	0.800	0.780	0.778	0.617	0.795	0.795	0.702	0.652
81	0.788	0.771	0.704	0.686	0.784	0.784	0.736	0.725
82	0.655	0.608	0.579	0.615	0.648	0.648	0.607	0.593
83	0.764	0.725	0.714	0.667	0.759	0.759	0.714	0.704
84	0.709	0.725	0.661	0.611	0.736	0.736	0.632	0.589
85	0.804	0.787	0.820	0.667	0.731	0.731	0.717	0.673
86	0.115	0.117	0.117	0.095	0.101	0.101	0.147	0.092
87	0.818	0.795	0.795	0.644	0.739	0.778	0.646	0.689
88	0.843	0.830	0.755	0.642	0.736	0.736	0.722	0.679
89	0.714	0.667	0.694	0.604	0.608	0.608	0.694	0.612
90	0.776	0.773	0.720	0.633	0.635	0.667	0.686	0.673
91	0.788	0.771	0.736	0.654	0.685	0.685	0.704	0.692
92	0.673	0.647	0.655	0.545	0.579	0.607	0.655	0.611
93	0.778	0.740	0.792	0.618	0.679	0.709	0.727	0.717
94	0.755	0.714	0.736	0.593	0.655	0.655	0.643	0.660
95	0.759	0.720	0.741	0.600	0.661	0.691	0.679	0.636
96	0.808	0.771	0.722	0.642	0.673	0.673	0.722	0.679
97	0.808	0.771	0.722	0.673	0.704	0.736	0.722	0.712
98	0.741	0.735	0.691	0.642	0.673	0.704	0.722	0.648
99	0.759	0.735	0.741	0.630	0.632	0.632	0.741	0.636
100	0.683	0.694	0.595	0.692	0.700	0.744	0.667	0.692
101	0.780	0.757	0.780	0.610	0.667	0.683	0.732	0.643
102	0.764	0.760	0.684	0.636	0.696	0.727	0.684	0.736
103	0.745	0.706	0.727	0.618	0.709	0.741	0.696	0.717

Continuação...

	48B	49	50	51	52	53	54	55
48B	1.000							
49	0.792	1.000						
50	0.818	0.824	1.000					
51	0.792	0.804	0.740	1.000				
52	0.818	0.796	0.804	0.685	1.000			
53	0.818	0.745	0.750	0.766	0.660	1.000		
54	0.818	0.759	0.800	0.679	0.843	0.623	1.000	
55	0.870	0.813	0.826	0.826	0.776	0.818	0.755	1.000
56	0.750	0.800	0.865	0.737	0.732	0.757	0.707	0.848
57	0.692	0.714	0.769	0.833	0.651	0.806	0.628	0.879
58	0.760	0.774	0.745	0.833	0.691	0.809	0.685	0.889
59	0.765	0.600	0.571	0.643	0.655	0.654	0.621	0.778
60	0.538	0.534	0.527	0.537	0.492	0.538	0.509	0.577
61	0.600	0.519	0.520	0.519	0.583	0.583	0.520	0.519
62	0.833	0.778	0.750	0.837	0.696	0.706	0.755	0.792
63	0.783	0.680	0.773	0.750	0.773	0.696	0.773	0.680
64	0.769	0.679	0.712	0.725	0.603	0.771	0.625	0.735
65	0.625	0.593	0.560	0.577	0.654	0.652	0.615	0.654
66	0.769	0.887	0.792	0.808	0.737	0.717	0.764	0.780
67	0.840	0.727	0.765	0.712	0.679	0.720	0.643	0.735
68	0.800	0.709	0.745	0.760	0.632	0.771	0.655	0.787
69	0.840	0.815	0.755	0.769	0.732	0.679	0.759	0.760
70	0.741	0.818	0.792	0.774	0.737	0.685	0.732	0.731
71	0.800	0.732	0.769	0.685	0.778	0.660	0.741	0.673
72	0.778	0.692	0.700	0.735	0.660	0.688	0.642	0.740
73	0.760	0.800	0.808	0.788	0.719	0.731	0.745	0.745
74	0.769	0.732	0.769	0.717	0.745	0.692	0.709	0.706
75	0.741	0.759	0.764	0.684	0.836	0.632	0.800	0.736
76	0.800	0.759	0.765	0.745	0.741	0.720	0.704	0.735
77	0.727	0.636	0.613	0.625	0.656	0.690	0.656	0.688
78	0.704	0.621	0.589	0.725	0.603	0.604	0.596	0.635
79	0.769	0.811	0.784	0.765	0.727	0.740	0.722	0.792
80	0.778	0.745	0.733	0.773	0.756	0.630	0.711	0.780
81	0.840	0.727	0.698	0.816	0.679	0.720	0.673	0.792
82	0.808	0.603	0.571	0.642	0.614	0.585	0.607	0.627
83	0.778	0.707	0.709	0.755	0.690	0.698	0.655	0.745
84	0.741	0.627	0.685	0.765	0.610	0.611	0.603	0.745
85	0.792	0.774	0.816	0.760	0.722	0.771	0.685	0.735
86	0.167	0.086	0.104	0.090	0.114	0.080	0.130	0.130
87	0.818	0.800	0.814	0.773	0.800	0.762	0.739	0.778
88	0.769	0.778	0.750	0.800	0.727	0.706	0.722	0.776
89	0.696	0.654	0.653	0.633	0.667	0.674	0.660	0.617
90	0.864	0.712	0.787	0.660	0.760	0.702	0.720	0.756
91	0.731	0.759	0.765	0.745	0.649	0.755	0.673	0.755
92	0.750	0.649	0.712	0.630	0.661	0.604	0.685	0.700
93	0.864	0.815	0.788	0.736	0.796	0.745	0.792	0.796
94	0.654	0.759	0.667	0.679	0.774	0.654	0.704	0.667
95	0.760	0.796	0.804	0.717	0.714	0.692	0.709	0.706
96	0.800	0.778	0.750	0.765	0.696	0.706	0.722	0.720
97	0.833	0.846	0.784	0.800	0.727	0.740	0.722	0.755
98	0.870	0.745	0.784	0.698	0.727	0.673	0.788	0.755
99	0.800	0.672	0.736	0.655	0.745	0.660	0.709	0.720
100	0.913	0.690	0.667	0.784	0.643	0.684	0.700	0.800
101	0.750	0.786	0.846	0.683	0.721	0.700	0.738	0.778
102	0.840	0.800	0.741	0.755	0.690	0.698	0.745	0.816
103	0.760	0.849	0.755	0.704	0.732	0.679	0.696	0.760

Continuação...

	56	57	58	59	60	61	62	63
56	1.000							
57	0.838	1.000						
58	0.763	0.914	1.000					
59	0.400	0.438	0.741	1.000				
60	0.524	0.561	0.574	0.438	1.000			
61	0.429	0.400	0.448	0.429	0.583	1.000		
62	0.707	0.750	0.804	0.655	0.582	0.500	1.000	
63	0.571	0.643	0.654	0.579	0.560	0.560	0.870	1.000
64	0.744	0.838	0.800	0.516	0.545	0.517	0.769	0.800
65	0.357	0.313	0.615	0.773	0.464	0.444	0.536	0.529
66	0.762	0.762	0.811	0.563	0.596	0.517	0.849	0.800
67	0.683	0.725	0.784	0.586	0.509	0.517	0.788	0.800
68	0.769	0.865	0.837	0.567	0.545	0.483	0.840	0.833
69	0.732	0.732	0.808	0.581	0.589	0.517	0.882	0.800
70	0.721	0.721	0.778	0.515	0.569	0.552	0.815	0.769
71	0.674	0.674	0.722	0.516	0.544	0.593	0.759	0.833
72	0.676	0.703	0.792	0.633	0.566	0.533	0.813	0.741
73	0.721	0.762	0.827	0.581	0.579	0.500	0.830	0.792
74	0.674	0.714	0.755	0.516	0.517	0.571	0.759	0.800
75	0.689	0.689	0.719	0.576	0.550	0.552	0.754	0.769
76	0.683	0.725	0.784	0.586	0.564	0.536	0.824	0.833
77	0.476	0.455	0.656	0.727	0.500	0.500	0.588	0.609
78	0.581	0.659	0.667	0.531	0.518	0.517	0.736	0.731
79	0.750	0.750	0.804	0.600	0.554	0.571	0.808	0.731
80	0.697	0.750	0.778	0.714	0.521	0.533	0.841	0.741
81	0.659	0.744	0.820	0.690	0.536	0.571	0.860	0.731
82	0.500	0.571	0.679	0.667	0.527	0.552	0.750	0.769
83	0.674	0.714	0.792	0.667	0.552	0.533	0.865	0.741
84	0.643	0.725	0.704	0.545	0.554	0.500	0.741	0.704
85	0.750	0.750	0.765	0.533	0.635	0.577	0.769	0.826
86	0.121	0.100	0.103	0.095	0.092	0.143	0.115	0.139
87	0.727	0.706	0.756	0.708	0.551	0.583	0.739	0.696
88	0.750	0.750	0.804	0.621	0.582	0.517	0.843	0.800
89	0.564	0.564	0.673	0.680	0.510	0.480	0.680	0.652
90	0.658	0.615	0.667	0.720	0.481	0.560	0.673	0.739
91	0.690	0.775	0.784	0.548	0.593	0.536	0.788	0.760
92	0.605	0.643	0.667	0.586	0.466	0.600	0.643	0.640
93	0.762	0.721	0.709	0.581	0.589	0.625	0.811	0.818
94	0.651	0.651	0.685	0.516	0.536	0.577	0.755	0.750
95	0.714	0.674	0.722	0.500	0.517	0.615	0.759	0.720
96	0.690	0.732	0.769	0.516	0.554	0.593	0.843	0.833
97	0.775	0.732	0.736	0.516	0.526	0.615	0.808	0.792
98	0.667	0.628	0.736	0.643	0.500	0.519	0.774	0.750
99	0.636	0.674	0.691	0.600	0.492	0.593	0.727	0.833
100	0.607	0.607	0.700	0.679	0.561	0.556	0.842	0.792
101	0.821	0.732	0.707	0.389	0.558	0.429	0.780	0.692
102	0.674	0.674	0.759	0.667	0.579	0.571	0.865	0.731
103	0.732	0.651	0.741	0.594	0.534	0.448	0.778	0.654

Continuação...

	64	65	66	67	68	69	70	71
64	1.000							
65	0.448	1.000						
66	0.778	0.552	1.000					
67	0.820	0.519	0.830	1.000				
68	0.875	0.448	0.811	0.820	1.000			
69	0.774	0.517	0.923	0.863	0.808	1.000		
70	0.745	0.500	0.925	0.865	0.778	0.923	1.000	
71	0.722	0.500	0.833	0.843	0.755	0.865	0.904	1.000
72	0.792	0.571	0.800	0.830	0.771	0.816	0.820	0.796
73	0.759	0.517	0.906	0.846	0.827	0.868	0.906	0.849
74	0.755	0.500	0.833	0.880	0.788	0.830	0.904	0.959
75	0.690	0.567	0.825	0.768	0.719	0.821	0.857	0.906
76	0.784	0.577	0.865	0.917	0.784	0.900	0.902	0.880
77	0.514	0.941	0.600	0.576	0.514	0.571	0.556	0.559
78	0.636	0.467	0.714	0.655	0.731	0.709	0.714	0.722
79	0.769	0.593	0.885	0.824	0.804	0.846	0.885	0.827
80	0.745	0.524	0.848	0.867	0.800	0.909	0.911	0.867
81	0.717	0.571	0.796	0.769	0.820	0.827	0.796	0.774
82	0.618	0.552	0.696	0.667	0.712	0.722	0.696	0.736
83	0.727	0.552	0.804	0.811	0.827	0.833	0.836	0.815
84	0.673	0.438	0.690	0.691	0.704	0.684	0.719	0.667
85	0.765	0.577	0.846	0.820	0.765	0.808	0.846	0.824
86	0.117	0.079	0.098	0.103	0.118	0.113	0.096	0.100
87	0.646	0.800	0.766	0.717	0.660	0.745	0.750	0.761
88	0.769	0.615	0.885	0.824	0.804	0.882	0.849	0.827
89	0.608	0.762	0.692	0.694	0.640	0.686	0.692	0.700
90	0.604	0.727	0.685	0.686	0.635	0.679	0.685	0.692
91	0.750	0.536	0.830	0.804	0.820	0.792	0.796	0.774
92	0.607	0.519	0.655	0.685	0.667	0.679	0.714	0.722
93	0.679	0.571	0.818	0.727	0.741	0.815	0.786	0.764
94	0.655	0.556	0.764	0.704	0.685	0.759	0.764	0.808
95	0.722	0.483	0.868	0.843	0.755	0.865	0.941	0.882
96	0.769	0.500	0.885	0.860	0.804	0.920	0.922	0.900
97	0.769	0.500	0.849	0.788	0.804	0.811	0.849	0.792
98	0.704	0.577	0.782	0.788	0.736	0.778	0.782	0.792
99	0.722	0.593	0.768	0.808	0.722	0.764	0.800	0.846
100	0.700	0.556	0.738	0.700	0.769	0.775	0.714	0.683
101	0.732	0.353	0.833	0.756	0.756	0.805	0.833	0.744
102	0.696	0.552	0.804	0.745	0.759	0.833	0.804	0.750
103	0.709	0.533	0.818	0.759	0.741	0.815	0.818	0.732

664

	72	73	74	75	76	77	78	79
72	1.000							
73	0.765	1.000						
74	0.796	0.849	1.000					
75	0.788	0.807	0.870	1.000				
76	0.870	0.846	0.880	0.833	1.000			
77	0.600	0.571	0.559	0.611	0.625	1.000		
78	0.720	0.696	0.722	0.719	0.717	0.528	1.000	
79	0.813	0.830	0.863	0.818	0.860	0.636	0.736	1.000
80	0.878	0.844	0.848	0.870	0.886	0.630	0.778	0.844
81	0.851	0.778	0.774	0.768	0.804	0.618	0.820	0.824
82	0.714	0.679	0.736	0.732	0.698	0.600	0.745	0.750
83	0.915	0.818	0.815	0.807	0.846	0.583	0.792	0.830
84	0.765	0.702	0.696	0.695	0.691	0.500	0.769	0.709
85	0.755	0.863	0.824	0.782	0.820	0.625	0.636	0.804
				0.120	0.020	0.100	0.117	0.101

Continuação...

	80	81	82	83	84	85	86	87
80	1.000							
81	0.884	1.000						
82	0.717	0.800	1.000					
83	0.889	0.920	0.808	1.000				
84	0.800	0.755	0.625	0.764	1.000			
85	0.778	0.717	0.618	0.759	0.736	1.000		
86	0.143	0.115	0.091	0.125	0.139	0.103	1.000	
87	0.775	0.739	0.604	0.729	0.660	0.795	0.095	1.000
88	0.886	0.860	0.717	0.865	0.709	0.804	0.114	0.800
89	0.682	0.694	0.588	0.706	0.585	0.745	0.100	0.795
90	0.689	0.686	0.585	0.698	0.642	0.700	0.096	0.872
91	0.761	0.769	0.698	0.778	0.691	0.820	0.101	0.739
92	0.739	0.685	0.561	0.696	0.673	0.667	0.132	0.646
93	0.795	0.727	0.632	0.737	0.655	0.808	0.127	0.745
94	0.761	0.736	0.698	0.745	0.661	0.750	0.103	0.756
95	0.844	0.741	0.643	0.782	0.667	0.824	0.086	0.723
96	0.886	0.824	0.717	0.830	0.679	0.804	0.101	0.739
97	0.822	0.755	0.655	0.764	0.709	0.804	0.101	0.739
98	0.745	0.691	0.655	0.732	0.679	0.769	0.115	0.778
99	0.844	0.741	0.673	0.782	0.667	0.755	0.115	0.778
100	0.806	0.795	0.800	0.780	0.750	0.675	0.103	0.750
101	0.781	0.651	0.533	0.705	0.674	0.825	0.097	0.714
102	0.826	0.811	0.709	0.818	0.732	0.727	0.111	0.766
103	0.783	0.696	0.603	0.737	0.655	0.774	0.099	0.708
	88	89	90	91	92	93	94	95
88	1.000							
89	0.714	1.000						
90	0.706	0.791	1.000					
91	0.824	0.660	0.654	1.000				
92	0.673	0.608	0.667	0.717	1.000			
93	0.778	0.654	0.679	0.792	0.709	1.000		
94	0.788	0.694	0.654	0.769	0.625	0.759	1.000	
95	0.792	0.635	0.660	0.774	0.755	0.796	0.709	1.000
96	0.880	0.680	0.673	0.824	0.736	0.811	0.788	0.900
97	0.808	0.647	0.673	0.788	0.704	0.846	0.788	0.863
98	0.741	0.680	0.740	0.755	0.673	0.745	0.722	0.792
99	0.792	0.735	0.796	0.741	0.722	0.764	0.741	0.778
100	0.769	0.632	0.757	0.725	0.650	0.732	0.659	0.683
101	0.738	0.600	0.650	0.721	0.600	0.833	0.682	0.829
102	0.796	0.642	0.731	0.811	0.727	0.800	0.778	0.782
103	0.745	0.654	0.648	0.727	0.621	0.782	0.727	0.796
	96	97	98	99	100	101	102	103
96	1.000							
97	0.880	1.000						
98	0.774	0.808	1.000					
99	0.827	0.759	0.759	1.000				
100	0.725	0.769	0.838	0.690	1.000			
101	0.762	0.805	0.780	0.705	0.679	1.000		
102	0.830	0.830	0.830	0.750	0.895	0.744	1.000	
103	0.745	0.811	0.778	0.672	0.732	0.897	0.800	1.000

ANEXO B: DENDROGRAMA MOSTRANDO AS RELAÇÕES FENÉTICAS ENTRE OS 103 ISOLADOS DE *Guignardia* spp. OS VALORES A ESQUERDA DOS AGRUPAMENTOS CORRESPONDEM AO VALOR DE P, OU SEJA, A PORCENTAGEM QUE ESTE AGRUPAMENTO APARECEU NOS 200 DENDROGRAMAS GERADOS A PARTIR DA REAMOSTRAGEM BOOTSTRAP, COM AUXÍLIO DO PROGRAMA WINBOOT.

Continuação...

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from Citrus. **Phytopathol.**, v.82, p.1377-1382, 1992.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 3 ed. New York: Academic Press, 1988. 803p.
- ANNIS, S.L.; GOODWIN, P.H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **Europ. J. Plant Pathol.**, v. 103, p. 1-14, 1997.
- APEL, P.C.; PANACCIONE, D.G.; HOLDEN, F.R.; WALTON, J.D. Cloning and targeted gene disruption of *XYL1*, a β 1,4-xylanase gene from the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*. **Molec. Plant-Microbe Interact.**, v.6, n.4, p.467-473, 1993.
- ARMALEO, D.; YE, G.N.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; SANFORD, J.C.; JONHNSTON, S.A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Curr. Genet.**, v.17, p.97, 1990.
- AZEVEDO, J.L. Recessive lethals induced by nitrous acid in *Aspergillus nidulans*. **Mutat. Res.**, v.10, p.11-17, 1970.
- AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo: Comp. Ed. Nacional/EDUSP. 1973, 288p.

- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L (Ed.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap.4, p.117-137.
- BACON, C.W.; PORTER, J.K.; ROBBINS, J.D.; LUTTELL, E.L *Epichlœ typhina* from toxic tall fescue pastures. **Appl. Environ. Microbiol.**, n.34, p. 576-581, 1977.
- BAGAGLI, E.; VALADARES, M.C.C.; AZEVEDO, J.L. Parameiosis in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. **Rev. Bras. Genet.**, v.14, n.2, p261-271, 1991.
- BAKER, R.E.D. Studies in the pathogenicity of tropical fungi. II. The ocorrence of latent infections indeveloping fruits. **Ann. Bot. (N.S.)**, Oxford, v.2, p.919-931, 1938.
- BALL, O.J.P.; PRESTIDGE, R.A.; SPROSEN, J.M. Interrelationships between *Acremonium lolii*, peramine, and lolitrem B in perennial ryegrass. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, n.4, p.1527-1533, 1995.
- BARKLUND, P.; KOWALSKI, T. Endophytic fungi in branches of Norway spruce with particular reference to *Tryblidiopsis pinastri*. **Can. J. Bot.**, v.74, n.5, p.673-678, 1996.
- BAYLEY, A.M.; MENA, G.L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transformation of four *Phytophthora* spp by microprojectile bombardment on intact mycelia. **Curr. Genet.**, v.23, p.42-46, 1993.
- BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.24, p.411-451. 1986.
- BENNINGER, D.M.; SKRYNIA, C.; PUKKILA, P.J.; CASSELTON, L.A. DNA-mediated transformation of the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. **EMBO Journal**, v.6, p.835-840, 1987.

- BERNHARD, F.; SCHULLERUS, D.; BELLEMANN, P.; NIMTZ, M.; COPLIN, D.L.; GEIDER, K. Genetic transfer of amylovoran and stewartan synthesis between *Erwinia amylovora* and *Erwinia stewartii*. **Microbiol.**, v.142, p.1087-1096, 1996.
- BERNSTEIN, M.E.; CARROLL, G.C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Can. J. Bot.**, v.55, n.6, p.644-653, 1977.
- BERTONI, M.D.; CABRAL, D. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis* II: Distribution of endophytes. **Nova Hedwigia**, v.46, p.491-502, 1988.
- BING, L.A.; LEWIS, L.C. Occurrence of the entomopathogenic *Beauveria bassiana* (Balsanto) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). **Agric. Ecosyst. and Environ.**, v.45, p.147-156, 1993.
- BISSET, J.; PALM, M.E. Species of *Phyllosticta* on conifers. **Can. J. Bot.**, v.67, p.3378-3385, 1989.
- BLACKMORE, E.J.A.; DOBSON, M.J.; HOCART, M.J.; LUCAS, J.A.; PEBERDY, J.F. Transformation of *Pseudocercospora herpotricoides* using two heterologous genes. **Curr. Genet.**, v.16, p.177-180, 1989.
- BOLKER, M. Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. **Fungal Gen. Biol.**, v.25, n.3, p.143-156, 1998.
- BOURETT, T.M.; HOWARD, R.J. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Can. J. Bot.**, v. 68, p.329-342, 1990.
- BRAUN, E.J.; HOWARD, R.J. Adhesion of *Cochliobolus heterostrophus* conidia and germlings to leaves and artificial surfaces. **Exp. Mycol.**, V.18, p.211-220, 1994.
- BREEN, J.P. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. **Ann. Ver. Entomol.**, n.39, p.401-423, 1994.
- BRODY, H.; CARBON, J. Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.6260-6263, 1989.

- BRUZZESE, E.; HASAN, S. A whole leaf clearing and staining technique for host specificity studies of rust fungi. **Plant Pathol.**, v.32, p.335-338, 1983.
- CABRAL, D. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis*: dynamics of fungal populations. **Trans. of the Brit. Mycol. Soc.**, v.85, p.501-511, 1985.
- CALHOUN, L.A.; FINDLAY, J.A.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. **Mycol. Res.**, v.96, n.4, p.281-286, 1992.
- CANTOR, C.R.; SMITH, C.L.; MATHEW, M.K. Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. **Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.**, v.17, p.287-304, 1988.
- CARLE, G.F.; OLSON, M.V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. **Nucl. Acids Res.**, v.12, p.5647-5664, 1984.
- CARROLL, G.C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Ed) **Microbiology of phyllosphere**, London: Cambridge University Press, 1986. p. 205-222.
- CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v.69, p. 2-9, 1988.
- CARROLL, G.C.; CARROLL, F. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. **Can. J. Bot.**, v.5, p.3034-3043, 1978.
- CASE, M.E.; SCHWEIZER, M.; KUSNER, S.R.; GILES, N.H. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.76, p.5259-5263, 1979.
- CERKAUSKAS, R.F. Latent colonization by *Colletotrichum* spp.: epidemiological considerations and implications for mycoherbicides. **Can. J. Plant Pathol.**, v.10, p.297-310, 1988.

- CHAI, B.L. & STICKLEN, M.B. Applications of biotechnology in turfgrass genetic improvement. **Crop Science**, v.38, n.5, p.1320-1338, 1998.
- CHAKRABOURT, B.N.; KAPOOR, M. Transformation of filamentous fungi by electroporation. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6737, 1990.
- CHAPELA, I.H.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E. Unusual ascospore germination in *Hypoxylon fragiforme*: first steps in the establishment of an endophytic symbiosis. **Can. J. Bot.**, v.68, p.2571-2575, 1990.
- CHRISTENSEN, B.R. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. **J. Bacteriol.**, v.10, p.181-202, 1989.
- CHRISTENSEN, M.J. Antifungal activity in grasses infected with *Acremonium* and *Epichloe* endophytes. **Australas. Plant Pathol.**, v.25, n.3, p.186-191, 1996.
- CHUMLEY, F.G.; VALENT, B. Genetic analysis of melanin deficient, nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. **Mol. plant Microbe-Interact.**, v.3, p.135-143, 1990.
- CLARK, C.L.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.J. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. **Mycolog. Res.**, v.93, p.508-512, 1989.
- CLAY, K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia**, v.73, p.358-362, 1987.
- CLAY, K.. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, v.69, p. 10-16, 1988.
- CLAY, K.. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. **Mycol. Res.**, v.92, n.1, p.1-12, 1989.
- CLEMENT, S.L.; PIKE, K.S.; KAISER, W.J.; WILSON, A.D. Resistance of endophyte-infected plants of tall fescue and perennial ryegrass to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphidae). **J. Kansas Entom. Soc.**, v.63, n.4, p.646-648, 1990.

- CLUTTERBUCK, A.J. Genetics of fungi. In: GOW, N.A.R.; GADD, G.M. (Eds) **The growing fungus**. London: Chapman & Hall, 1994. cap.11, p.239-254.
- COOLEY, R.N.; GORCOM, R.F.M.; VAN DEN HOLDEL, C.A.M.J.J.; CATEN, C.E. Isolation of a benomyl-resistant allele of the β -tubulin gene from *Septoria nodorum* and its use as a dominant selectable marker. **J. Gen. Microbiol.**, v.137, p.2085-2091, 1991.
- COOPER, L.A.; GADD, G.M. Differentiation and melanin production in hyaline and pigmented strains of *Microdochium bolleyi*. **Antonie van Leeuw.**, v.50, p.53-62, 1984.
- COSTERTON, J.W.; LAWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Ann. Rev. Med. Microbiol.**, v.1, p.143-150, 1995.
- COVERT, S.F.; ENKERLI, J.; MIAO, V.P.W.; VANETTEN, H.D. A gene for maackiain detoxification from a dispensable chromosome of *Nectria haematococca*. **Mol. Gen. Genet.**, v.251, n.4, p.397-406, 1996.
- CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A. *Mycosphaerella parkii* and *Phyllosticta eucalyptorum*, two new species from Eucaliptus leaves in Brazil. **Mycol. Res.**, Cambridge, v.97, p.582-584, 1993.
- CROWHURST, R.N.; HAWTHORNE, B.T.; RIKKERING, E.H.A.; TEMPLETON, M.D. Differentiation of *Fusarium solani* sp *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. **Curr. Genet.**, Berlin, v.20, p.391-396, 1991.
- DANTAS-BARBOSA, C.; ARAÚJO, E.F.; MORAES, L.M.P.; VAINSTEIN, M.H.; AZEVEDO, M.O. Genetic transformation of germinated conidia of the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* to hygromycin B resistance. **FEMS Microb. Lett.**, v. 169, p. 185-190, 1998.
- DAVIDSE, P. Benzimidazole fungicides mechanism of action and biological impact. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.24, p.43-65, 1986.

- DAVIS, B. Factors influencing protoplast isolation. In PEBERDY, J.F. & FERENZY, L. (Eds). **Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics**. New York, Dekker, p. 45-72.1985.
- DE CAL, A.; MELGAREJO, P. Effects of *Penicillium frequentans* and its antibiotics on unmelanized hyphae of *Monilinia laxa*. **Phytopathol.**, v.84, p.1010-1014, 1994.
- DE WIT, P.J.G.M. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.30, p.391-418, 1992.
- DE WIT, P.J.G.M. The molecular basis of gene-for-gene systems in plant-pathogen interactions. In: ZAMBOLIM & DO VALE (eds). **Resistência de Plantas a Doenças: Palestras do XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. p.64-69.1997.
- DE WIT, P.J.G.M.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.F.J.M.; VOSSEN, P.M.J.; JOOSTEN, M.H.A.J.; COZIJNSEN, T.J.; HONEE, G.; WUBBEN, J.P.; DANHASH, N.; VAN KAN, J.A.L.; MARMEISSE, R.; VAN DEN BROEK, H.W.J. Molecular cloning and functions of avirulence and pathogenicity genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. In: NESTER, E.W.; VERMA, D.P.S. (Eds). **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions**. Netherlands: Klumer Academic Publishers, 1993. p.289-298.
- DEAN, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.35, p.211-234. 1997.
- DENNY, T. Involvement of bacterial exopolysaccharides in plant pathogenesis. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.33, p.173-197, 1995.
- DHAWALE, S.S.; PAIETTA, J.V.; MARZLUF, G.A. A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora crassa*. **Curr. Genet.**, v.8, p.77-79, 1984.
- DICKMAN, M.B. Whole cell transformation of the alfalfa fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. **Curr. Genet.**, v.14, p.241-216, 1988.

- DICKMAN, M.B.; PATIL, S.S. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit. **Mol. Plant pathol.**, v.28, p.235-242, 1986.
- DIOLEZ, A.; LANGIN, T.; GERLINGER, C.; BRYGOO, Y.; DABOUSSI, M-J. The *nia* gene of *Fusarium oxysporum*: isolation, sequence and development of a homologous transformation system. **Gene**, v.131, p.61-67, 1993.
- DOOS, R.P.; CLEMENT, S.L.; KUY, S.R.; WELTY, R.E. A PCR-based technique for detection of *Neotyphodium* endophytes in diverse accessions of tall fescue. **Plant disease**, v.82, n.7, p.738-740, 1998.
- DURRELL, L.W. The composition and structure of walls of dark fungus spores. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v.23, p.339-345, 1964.
- DURRENBERGER, F.; KRONSTAD, J. The *ukc1* gene encodes a protein kinase involved in morphogenesis, pathogenicity and pigment formation in *Ustilago maydis*. **Mol. Gen. Genet.**, v.261, n.2, p.281-289, 1999.
- FAETH, S.H.; HAMMON, K.E. Fungal endophytes and phytochemistry of oak foliage: determinants of oviposition preference of leafminers? **Oecologia**, v.108, n.4, p.728-736, 1996.
- FARR, D.F.; BILLS, G.F.; CHAMURIS, G.P.; ROSSMAN, A.Y. **Fungi on plants and plant products in the United States**. APS Press, 1989.
- FEICHTENBERGER, E. Mancha preta ou pinta preta dos citros. **Laranja & Cia**, n.43, p.10-11, 1996.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.366-369, 1985.
- FINCHAM, J.R.S.; DAY, P.R.; RADFORD, A. **Fungal Genetics**. California: University of California Press, 1979. cap.3, p.51-71: Induction, isolation and characterization of mutants.
- FINCHAM, J.R.S. Transformation of fungi. **Microbiol. Rev.**, v.53, p.148-170, 1989.

- FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. **Botanica Helvetica**, v.94, p.249-253, 1984.
- FISHER, P.J.; PETRINI, O. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England and Switzerland. **Mycol. Res.**, v.94, n.3, p.313-319, 1990.
- FISHER, P.J.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; SUTTON, B.C. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* from England, Majorca and Switzerland. **New Phytol.**, v.127, n.1, p.133-137, 1994.
- FOUTZ, K.R.; WOLOSHUK, C.P.; PAYNE, G.A. Cloning and assignment of linkage group loci to a karyotypic map of the filamentous fungus *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, v.87, n.6, p.787-794, 1995.
- FREAN, R.T. Physiological studies with *Guignardia citricarpa* Kiely, the cause of the black spot disease of citrus. **S. Afr. J. Sci.**, v.9, P.777-994, 1966.
- FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R.J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. **Science**, v.260, p.75-78, 1993.
- FUNGARO, M.H.P.; RECH, E.; MUHLEN, G.S.; VAINSTEIN, M.H.; PASCON, R.C.; QUEIROZ, M.V. PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardeament on intact conidia. **FEMS Microbiol. Letters**, v.125, p.293-298, 1995.
- FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap.8, p.205-227.
- GACESA, P.P. Bacterial alginate biosynthesis – recent progress and prospects. **Microbiol.**, v.144, p.1133-1143, 1998.
- GLEEN, A.E.; BACON, C.W.; PRICE, R.; HANLIN, R.T. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. **Mycologia**, v.88, n.3, p.369-383, 1996.

- GLIENKE, C. Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD. Curitiba, 1995. 115p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal do Paraná.
- GLIENKE, C.; WULFF, N.A.; AZEVEDO, J.L. Microscopia eletrônica de varredura no estudo do fungo *Guignardia citricarpa* Kiely. Anais do 13º Encontro sobre temas de genética e melhoramento, ESALQ/USP. p. 38, 1996.
- GOETTEL, M.S.; ST. LEGER, R.S.; BHAIRI, S.; JUNG, M.K.; OAKLEY, B.R.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. **Curr. Genet.**, v,17, p.129-132, 1990.
- GOLDMAN, G.H. Estudos genéticos e produção de celulase em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1988. p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- GOLDMAN, G.H.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELA, A. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high voltage electric pulse. **Curr. Genet.**, v.17, p.1167-1174, 1990.
- GOMES, L.H. Avaliação de quatro métodos para a caracterização de leveduras. Piracicaba, 1995. 89p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- GOMEZ, I.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. **Mol. Gen. Genet.**, v.256, n.2, p.127-135, 1997.
- GONZALEZ-VILA, F.J.; SAIZ-JIMENEZ, C.; LENTZ, H.; LUDEMANN, H.D. ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of fungal melanins. **Z. Naturforsch.**, v.33c, p.291-293, 1978.
- GOODAY, G.W. Cell walls. In: GOW, N.A.R.; GADD, G.M. (Eds) **The growing fungus**. London: Chapman & Hall, 1995. cap.3, p.43-62.

- GOODWIN, P.H.; ANNIS, S.L. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p.2482-2486, 1991.
- GOOSEN, T.; DEBETS, F. Molecular genetic analysis. In: BOS, C.J. (Ed.) **Fungal genetics: principles and practice**. Netherlands: Marcel Dekker, Inc., 1996. Cap.5, p.97-117.
- GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIMON, C.J.; MUEHLBAUER, F.J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. **Phytopathol.**, v.83, n.6, p.612-614, 1993.
- GRIFFIN, A.M.; MORRIS, V.J.; GASSON, M.J. Identification, cloning and sequencing the *aceA* gene involved in acetan biosynthesis in *Acetobacter xilinum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.137, p.115-121, 1996.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1984.
- GROPPE, K.; BOLLER, T. PCR assay based on a microsatellite-containing locus for detection and quantification of *Epicchloe* endophytes in grass tissue. **Appl. and Env. Microb.** v. 63, n.4, p. 1543-1550, 1997.
- GROTELUESCHEN, J.; METZENBERG, R.L. Some properties of the nucleus determines the competence of *Neurospora crassa* for transformation. **Genetics**, v.139, p.1515-1551, 1995.
- GROPPE, K.; BOLLER, T. PCR assay based on a microsatellite-containing locus for detection and quantification of *Epichloë* endophytes in grass tissue. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.4, p.1543-1550, 1997.
- GUTHRIE, P.A.I.; MAGILL, C.W.; FREDERIKSEN, R.A.; ODVODY, G.N. Random amplified polymorphic DNA markers: a systems for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathol.**, v.82, 832-835, 1992.

- HAMER, J.E.; HOWARD, R.J. CHUMLEY, F.G.; VALENT, B. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. **Science**, v.239, p.288-290, 1988.
- HE, C.; RUSU, A.G.; POPLAWSKI, A.M.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M. Transfer of supernumerary chromosome between vegetatively incompatible biotypes of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Genetics**, v.150, p.1459-1466, 1998.
- HENSEL, M.; HOLDEN, D.W. Molecular genetic approaches for the study of virulence in both pathogenic bacteria and fungi. **Microb.**, v.142, p.1049-1058, 1996.
- HERBERT, J.A.; GRECH, N.M. A strains of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa. **Plant Disease**, v.69, p.1007, 1985.
- HERD, S.; CHRISTENSEN, M.J.; SAUNDERS, K.; SCOTT, D.B.; SCHMID, J. Quantitative assessment of *in planta* distribution of metabolic activity and gene expression of na endophytic fungus. **Microbiol.**, v.143, p.267-275, 1997.
- HILBER, U.W.; BODMER, M.; SMITH, F.D.; KOLLER, W. Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana*. **Curr. Genet.**, v.25, p.124-127, 1994.
- HINNEN, .A.; HICKS, J.B.; FINK, G.R. Transformation of yeast chimeric *Co/E1* plasmid carrying *LEU2*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.75, p.1929-1933, 1978.
- HOLMES, G.J; ECKERT, J.W.; PITT, J. I. Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of Citrus fruits. **Phytopathol.**, v.84, p.719-727, 1994.
- HOWARD, R.J.; FERRARI, M.A. Role of melanin in appressorium function. **Exper. Mycol.**, v.13, p.403-418, 1989.
- HOWLETT, B.J. An electrophoretic karyotype for *Phytophthora megasperma*. **Exp. Mycol.**, v.13, p.199-202, 1989.
- HOWLETT, B.J. Genome analysis of the fungal plant pathogen, *Leptosphaeria maculans* using pulsed field gel electrophoresis. **Electroph.**, v.18, n.9, p.1544-1547, 1997.

- HULBERT, S.H.; ILOTT, T.W.; LEGG, E.J.; LINCOLN, S.E.; LANDER, E.S.; MICHELMORE, R.W. Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. **Genetics**, v.120, p.947-958, 1988.
- ITO, H.; FUKUDDA, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A. Transformation of intact cells treated with alkali cations. **J. Microbiol.**, v.153, p.163-168, 1983.
- JAILLOUX, F. In vitro production of the teleomorph of *Guignardia bidwellii*, causal agent of black rot of grapevine. **Can. J. Bot.**, v.70, p. 254-257, 1991.
- JANEX-FAVRE, M.C., PARGUEY-LEDUC, A.; JAILLOUX, F. The ontogeny of pycnidia of *Guignardia bidwellii* in culture. **Mycol. Res.**, v.97, p.1333-1339, 1993.
- JOHNSON, M.C.; DAHLMAN, D.L.; SIEGEL, M.R.; BUSH, L.P.; LATCH, G.C. Insect feeding deterrents in endophyte infected tall fescue. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, p.558-571, 1985.
- JOHNSON, J.A.; WHITNEY, N.J. A study of fungal endophytes of needle of balsam fir (*Abies balsamea*) and red spruce (*Picea rubens*) in New Brunswick, Canada, using culture and electron microscope techniques. **Can. J. Bot.**, v.67, p.3513-3516, 1989.
- JOHNSTON, P.R.; FULLERTON, R.A. *Cryptosporiopsis citri* sp. nov., cause of a citrus leaf spot in the Pacific Islands. **New Zealand Journal of Exper. Agric.**, v.16, p.159-63, 1988.
- JONES, M.J.; EPSTEIN, L. Adhesion of *Nectria haematococca* macroconidia. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, V. 35, p.453-461, 1989.
- JONGE, P.; JONGH, F.C.M.; MEIJERS, R.; STEENSMA, H.Y.; SCHFFERS, W.A.; Orthogonal-field alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts. **Yeast**, v.2, p.193-204, 1986.
- JU, Y.; SACALIS, J.N.; STILL, C.C. Bioactive flavonoids from endophyte-infected blue grass (*Poa ampla*). **Journ. Agric. Food Chem.**, v.46, n.9, p.3785-3788.

- JUDELSON, H.S.; COFFEY, M.D.; ARREDONDO, F.R.; TYLER, B.M. Transformation of the oomycete pathogen *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* occurs by DNA integration into single or multiple chromosomes. **Curr. Genet.**, v.23, p.211-218, 1993.
- JUDELSON, H.S.; MICHELMORE, R.W. Strategies for cloning avirulence genes from *Bremia lactucae*. In: STASKAWICZ, P. AHLQUIST, P.; YODER, O. Molecular biology of plant-pathogen interactions. **Symp. Mol. Cell. Biol.**, v.101, p.71-85, 1989.
- KAVA-CORDEIRO, V. Cariótipos eletroforéticos de linhagens selvagens e mutantes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Curitiba, 1993. 92p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal do Paraná.
- KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp.: The ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proc. Linn. Soc. N.S.W.**, v.73, p.249-292, 1948.
- KIM, H.G.; MEINHARDT, L.W.; BENNY, U.; KISTLER, H.C. *Nrs1*, a repetitive element linked to pisatin demethylase genes on a dispensable chromosome of *Nectria haematococca*. **Molec. Plant-Microbe Interact.**, v.8, n.4, p.524-531, 1995.
- KIMMONS, C.A.; GWINN, K.D.; BERNARD, E.C. Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. **Plant Disease**, v.74, n.10, p.757-761, 1990.
- KINDEL, L.L.; ANDREWS, J.H.; NORDHEIM, E.V. Fungal immigration dynamics and community development on apple leaves. **Microbial Ecology**, v.18, p.45-58, 1989.
- KINSCHERF, T.G.; LEONG, S.A. Molecular analysis of the karyotype of *Ustilago maydis*. **Chromosoma**, v.96, n.6, p.427-433, 1988.
- KOGA, H. Biological control in grasses by organisms in the plant (endophytes). **Mycotoxins**, v.41, p.5-8, 1995.

- KOLATTUKUDY, P.E.; LI, D.; HWANG, C.S.; FLAISHMAN, M.A. Host signals in fungal gene expression involved in penetration into the host. **Can. J. Bot.** (suppl.1), p. 51160-51168, 1995.
- KREUZINGER, N.; PODEU, R.; GRUBER, F.; GOBL, F.; KUBICEK, C.P. Identification of some ectomycorrhizal basidiomycetes by PCR amplification of the *gpd* genes. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.62, n.9, p.3432-3438, 1996.
- KRUPINSKY, J.M.; TOBER, D.A. Leaf spot disease of little bluestem, big bluestem, and sand bluestem caused by *Phyllosticta andropogonivora*. **Plant Disease**, St Paul, v.74, n.6, p.442-445, 1990.
- KUBO, Y.; TAKAMO, Y.; ENDO, N.; YASUDA, N.; TAJIMA, S.; FURUSAWA, I. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. **Appl. Environ. Microb.**, v.62, n.12, p.4340-4344, 1996.
- KUO, K.; HOCH, H.C. Visualization of the extracellular matrix surrounding pycnidiospores, germlings, and appressoria of *Phyllosticta ampellicida*. **Mycologia**, v.6, p.759-771, 1995.
- KUO, K.; HOCH, H.C. Germination of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores: prerequisite of adhesion to the substratum and the relationship of substratum wettability. **Fungal Gen. Biol.** v.20, p.18-29, 1996a.
- KUO, K.; HOCH, H.C. The parasitic relationship between *Phyllosticta ampellicida* and *Vitis vinifera*. **Mycologia**, v.88, p. 626-634, 1996b.
- KWON-CHUNG, K.J.; GOLDMAN, W.E.; KLEIN, B.; SZANISZLO, P.J. Fate of transformation DNA in pathogenic fungi. **Medical Mycol.**, v.36 (Supl. 1), p.38-44, 1998.
- LECLAIR, S.; ANSAN-MELAYAH, D.; ROUXEL, T.; BALESSENT, M. Meiotic behaviour of the minchromosome in the phytopathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. **Curr. Genet.**, v.30, n.6, p541-548, 1996.

- LEIGH, J.A.; COPLIN, D.L. Exopolisaccharides in plant-bacterial interaction. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.46, p.307-346, 1992.
- LEONARD, K.J. Color mutants in *Cochliobolus carbonum*. **Can. J. Bot.**, v.50, p.1283-1285, 1972.
- LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; CARROLL, G.C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycol. Res.**, v.96, p.287-295, 1992.
- LIEW, E.C.Y.; IRWIN, J.A.G. Comparative studies on *Phytophthora megasperma* isolates from chickpea collected in Australia and Spain. **Mycol. Res.**, v.98, p.1284-1290, 1994.
- LIU, D.; VAN HEESWIJCK, R.; LATCH, G.; LEONFORTE, T.; PANACCIO, M.; LANGFORD, C.; CUNNINGHAM, P.; REED, K. Rapid identification of *Acremonium lolii* and *Acremonium coenophialum* endophytes through arbitrarily primed PCR. **FEMS-Microbiol. Lett.**, v.133, p.95-98, 1995.
- LIYANAGE, H.D.; McMILLAN Jr., R.T.; KISTLER, H.C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathol.**, v.82, p.1371-1376, 1992.
- LODGE, D.J.; FISHER, P.J.; SUTTON, B.C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, v.88, p.733-738, 1996.
- LONGO, A.C. Transformação genética e variabilidade detectada por RAPD em isolados endofíticos de *Colletotrichum musae*. Piracicaba, 1995. 101p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- MAGEE, B.B.; MAGEE, P.T. Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in *Candida* species. **J. Gen. Microb.**, v.133, p.425-430, 1987.

- MAGOON, J.; MESSING-AL-AIDROOS, K. Epistatic relationships and linkage among colour markers of the imperfect entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Can. J. Genet. Cytol.**, v.28, p.96-100, 1986.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- MANICOM, B.Q.; BAAYEN, R.P. Restriction fragment length polymorphisms in *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi and other fusaria from *Dianthus* species. **Plant Pathol.**, v.42, p.851-857, 1993.
- MANICOM, B.Q.; BAR-JOSEPH, M.; KOTZE, J.M. A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. **Phytopathol.**, v.80, p.336-339, 1990.
- MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEN-YEPHET, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. **Phytopathol.**, v.84, p.98-101, 1993.
- MAOR, R.; PUYESKY, M.; HORWITZ, B.A.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycol. Res.**, v.102, p.491-496, 1998.
- MARKS, S.; CLAY, K. Physiological responses of *Festuca arundinacea* to fungal endophyte infection. **New Phytologist.**, v.133, p.727-733, 1996.
- MARMEISSE, R.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.F.J.M.; GOOSEN, T.; DE WIT, P.G.J.M.; VAN DEN BROEK. Disruption of the avirulence gene *avr9* in two races of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* causes virulence on tomato genotypes with the complementary resistance gene *Cf9*. **Molec. Plant-Microbe Interact.**, v.6, p.412-417, 1993.
- MARTIN, F. Meiotic instability of *Pythium sylvaticum* as demonstrated by inheritance of nuclear markers and karyotype analysis. **Genetics**, v. 139, p.1233-1246, 1995.

- MASEL, A.; BRAITHWAITE, K.; IRWIN, J.; MANNERS, J. Highly variable molecular karyotypes in plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Curr. Genet.**, v.18, p.81-86, 1990.
- MASEL, A.; IRWIN, A.; MANNERS, J. DNA addition or deletion is associated with a major karyotype polymorphism in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mol. Gen. Genet.**, v.237, p.73-80, 1993.
- McCUTCHEON, T.L.; CARROLL, G.C.; SCHWAB, S. Genotypic diversity in populations of a fungal endophyte from Douglas Fir. **Mycologia**, v.85, p.180-186, 1993.
- McKAY, G.J.; EGAN, D.; MORRIS, E.; SCOTT, C.; BROWN, A.E. Genetic and morphological characterization of *Cladobotryum* species causing cobweb disease of mushrooms. **Appl. Environ. Microb.**, v.65, p.606-610, 1999.
- McMILLAN Jr., R.T. *Guignardia citricarpa* a cause of black spot on mango foliage in Florida. **J. Phytopath.**, v.117, p.260-264, 1986.
- McONIE, K.C. The latent occurrence in *Citrus* and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathol.**, v.54, p.40-43, 1964.
- MEGNEGNEAU, P.; DEBETS, F.; HOCKSTRA, R.F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. **Curr. Genet.**, v.23, p.323-329, 1993.
- MEIJER, G.; MEGNEGNEAU, G.; LINDERS, E.G.A. Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. **Mycol. Res.**, v.98, p.267-276, 1994.
- MELGAREJO, P.; DE CAL, A.; SAGASTA, E.M. Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia taxa* in culture. **Can. J. Bot.**, v.67, p.83-87, 1988.

- MIAO, V.P.; COVERT, S.F.; VANETTEN, H.D. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable (B) chromosome. **Science**, v.254, p.1773-1776, 1991.
- MICHELMORE, R.W.; HULBERT, S.H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.25, p.383-404, 1987.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.9828-3982, 1991.
- MILES, C.O.; DI MENNA, M.E.; JACOBS, S.W.L.; GARTHWAITE, I.; LANE, G.A.; PRESTIDGE, R.A.; MARSHALL, S.L.; WILKINSON, H.H.; SCHARDE, C.L.; BALL, O.J.P.; LATCH, G.C.M. Endophytic fung in Indigenous Australasian grasses associated with toxicity to livestock. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, p.601-606, 1998.
- MONTENEGRO, E.; FIERRO, F.; FERNANDEZ, F.J; GUTIÉRREZ, S.; MARTÍN, J.F. Resolution of chromosomes III and VI of *Aspergillus nidulans* by pulsed-field gel electrophoresis shows that the penicillin biosynthetic pathway genes *pcbAB*, *pcbC* and *penDE* are clustered on chromosome VI (3.0 megabases). **J. Bacteriology**, v.11, p.7063-7067, 1992.
- MORRIS, C.E.; MONIER, J.M.; JACQUES, M.A. Methods of observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.63, p.1570-1576, 1997.
- MÜHLEN, G.S. Eletroforese em campo pulsado: evolução da técnica e sua aplicação em um caso específico. Piracicaba, 1995. 126 p. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MURRAY, F.R.; LATCH, G.C.M.; SCOTT, D.B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molec. Cell. Biol.**, v.233, p.1-9, 1992.

- NICHOLSON, R.L.; EPSTEIN, L. Adhesion of fungi to the plant surface prerequisite of pathogenesis. In COLE, G.T.; HOCH, H.C. (Eds). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 1991. p.3-24.
- NICHOLSON, P.; REZANOOR, H.N. The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and detect variation in *Pseudocercospora herpotrichoides*. **Mycol. Res.**, v.98, p.13-21., 1994.
- NIWA, O.; MATSUMOTO, T.; YANAGIDA, M. Construction of a minichromosome by deletion and its mitotic and meiotic behavior in fission yeast. **Mol. Genet.**, v. 203, p.397-405, 1986.
- NODA, H.; KAWAHARA, N. Electrophoretic karyotype of intracellular yeast like symbiotes in rice planthoppers and anobiid beetles. **J. Invert. Pathol.**, v.65, p.118-124, 1995.
- NOGUEIRA, N.L.; BARROSO, P.A.V. Microscopia eletrônica aplicada aos estudos de ecologia microbiana. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap.11, p.279-307.
- NOVAK, C.; KUCK, U. Development of an homologous transformation system for *Acremonium chrysogenum* based on the β -tubulin gene. **Curr. Genet.**, v.25, p.34-40, 1994.
- OKANE, I.; NAKAGINI, A.; ITO, T. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. **Canad. J. Bot.**, v. 76, p.657-663, 1998.
- ORBACH, M.J.; CHUMLEY, F.G.; VALENT, B. Electrophoretic karyotypes of *Magnaporthe grisea* pathogens of diverse grasses. **Molec. Plant-Microbe Interact.**, v.9, p.261-271, 1996.
- ORBACH, M.J.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R.W.; YANOFSKY, C. An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. **Molec. Cell. Biol.**, v.8, p.1469-1473, 1988.
- PAMPHILE, J.A. Estudos genéticos no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1992. 105p. Dissertação

(M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.

PANG, E.C.K.; HALLORAN, G.M. Genetics of virulence in *Leptosphaeria maculans* (Desm.) ces. Et De Not., the cause of blackleg in rapessed (*brassica napus* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 93, p.301-306, 1996.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor. Appl. Genet.**, v.85, p.985-993, 1993.

PASCHOLATI, S.F.; DEISING, H. LEITE, B.; ANDERSON, D.; NICHOLSON, R.L. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** v.42, p.37-51, 1993.

PATEL, B.N.; PATEL, R.C.; TILVA, D.G. *Phyllosticta* leaf spot: a new disease in Bidi tobacco nursery. **Tobacco Res.**, v.14, p.1176-1178, 1988.

PATERSON, R.R.M.; BRIDGE, P.D. **Biochemical techniques for filamentous fungi**. CAB International, 125p., 1994.

PENG, M.; SINGH, N.K.; LEMKE, P.A. Recovery of recombinant plasmids from *Pleurotus ostreatus* transformants. **Curr. Genet.**, v.22, p.53-59, 1992.

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. **Mycologia**, v.85, p.362-364, 1993.

PEREIRA, J.O.; VIEIRA, M.L.C.; AZEVEDO, J.L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World J. Microbiol. Biotechn.**, v.15, p.43-46, 1999.

PERPETUA, N.S.; KUBO, Y.; YASUDA, N.; TAKANO, Y.; FURUSAWA, I. Cloning and characterization of a melanin biosynthetic THTI reductase gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*. **Mol. Plant Microb. Interact.**, v. 9, p.323-329, 1996.

- PETERS, S.; DRAEGER, S.; AUST, H.J.; SCHULZ, B. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. **Mycology**, v.90, p.360-367, 1998.
- PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J VAN DEN (Eds), **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge, U.K: Cambridge University Press, 1986, p.175-187.
- PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Eds). **Microbial ecology of leaves**. Springer Verlag, 1991, p.179-197.
- PETRINI, O.; FISHER, P.J. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. **Mycol. Res.**, v.94, n.8, p.1077-1080, 1990.
- PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; RODRIGUES, K.F. *Xylariaceae* endophytes: an exercise in biodiversity. **Fitopatol. Brasil.**, v.20, n.4, p.531-539, 1995.
- PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F.E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Can. J. Bot.**, v.60, p.789-796, 1982.
- PILGERAN, A.L.; HENSON, J.M. Transformation and cotransformation of *Gaeumeromyces graminis* to phleomycin resistance. **Phytopathol.**, v.80, p.1124-1129, 1990.
- PIMENTEL, I.C. Estudos genéticos em *Paecilomyces lilacinus* (THOM) Samson, agente de controle biológico de nematóides. Piracicaba, 1991. 115p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; MÜHLEN, G.S. Aplicações da técnica de eletroforese em campo pulsado para separação de cromossomos de microrganismos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap.9, p.229-251.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L. **Genética de Fungos no Laboratório**. Manaus: Ed. Universidade do Amazonas. 1998, 138p.

- PONS, N. Estudio taxonomico de especies de *Phoma* y *Phyllosticta* sobre caña de azucar (saccharum sp). **Fitopat. Venez.**, v.3, p.34-43, 1990.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MAC DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.5, p.141-238, 1953.
- PUHALLA, J.E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. **Can. J. Bot.**, v.63, p.179-183, 1985.
- PUNITHALINGAM, E. The conidial appendage in *Phyllosticta* spp. **Nova Hedwigia**, v.36, p.151-175, 1982.
- PUNT, P.J. OLIVER, R.P.; DINGEMANSE, M.A.; POUWELS, P.H.; VAN DER HONDEL, C.A. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. **Gene**, v. 56, p.117-124, 1987.
- QUINTERO, E.J.; WEINER, R.M. Evidence for the adesive function of the exopolysaccharide of *Hyphomonas* strain MHS-3 in its attachment to surfaces. **Appl. Environ. Microb.**, v.61, p.1897-1903, 1995.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Lett. Appl. Microb.**, v.1, p.17-20, 1985.
- RAYNER, A.D.M. The phytopathological significance of mycelial individualism. **Ann Rev. Phytopathol.**, v.29, p.305-325, 1991
- REDDY, P.V.; LAM, C.K.; BELANGER, F.C. Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. **Plant Physiol.**, v.111, n.4, p.1209-1218, 1996.
- REISS, E.; TANAKA, K.; BRUKER, G.; CHAZALET, V.; COLEMAN D.; DEBEAUPUIS, J.P.; HANAZAWA, R.; LATGÉ, J.P.; LORTHOLARY, J.; MAKIMURA, K.; MORRISON, C.J.; MURAYAMA, S.Y.; NAOE, S.; PARIS, S.; SARFATI, J.; SHIBUYA, K.; SULLIVAN, D.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI,

- H. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. **Medical Mycol.**, v.36 (supl.1), p.249-257, 1998.
- RIBEIRO, L.A. Variabilidade genética por RAPD em fungos endofíticos do gênero *Penicillium* provenientes de *Zea mays*. Curitiba, 1995. 90 p. Dissertação (M.S.) – Universidade Federal do Paraná.
- RICHEY, M.G.; MAREK, E.T.; SCHARDL, C.L.; SMITH, D.A. Transformation of filamentous fungi with plasmid DNA by electroporation. **Phytopathol.**, v.79, p.844-847, 1989.
- RODRIGUES, K.F.; SAMUELS, G.J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Mycol. Res.**, v.94, p. 827-830, 1990.
- RODRIGUES, K.F.; SAMUELS, G.J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. **J. Basic Microbiol.**, v.39, n.2, p.131-135, 1999.
- RODRIGUEZ, R.J.; REDMAN, R.S. Fungal life-styles and ecosystem dynamics: Biological aspects of plant pathogens, plant endophytes and saprophytes. **Advances in Bot. Res.**, v.24, p. 169-193. 1997.
- RODRIGUEZ, R.J.; REDMAN, R.S. Molecular transformation and genome analysis of *Colletotrichum*. In: BAYLEY, J.A.; JEGGER, M.J. (Eds). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Oxford: CAB International, p.47-66. 1992.
- RODRIGUEZ, R.J.; YODER, O.C. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemutiarum*). **Gene**, v.54, p.73-81, 1987.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, Exeter Publishing, 1988.
- SAIKI, R.K.; SCARF, S.; FALOONA, F.A.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, n.230, p.1350-1354, 1985.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2^aed.CSH Press, 1989.
- SAMUELS, G.J.; SEIFERT, K.A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.33, p.37-67, 1995.
- SANCHEZ-FERNANDEZ, R.; UNKLES, S.E.; CAMPBELL, E.I.; MACRO, J.A.; CERDÁ-OLMEDO, E.; KINGHORN, J.R. Transformation of the filamentous fungus *Gibberella fujikuroi* using the *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase. **Molec. Gen. Genet.**, v.255, p.231-233, 1991.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SCHÄFER, C.; WÖSTEMEYER, J. Random Primer Dependent PCR differentiates Aggressive from Non-Aggressive isolates of the Oilseed Rape Pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **J. Phytopathol.**, v.136, p.124-136, 1992.
- SCHARDL, C.L; PHILLIPS, T.D. Protective grass endophytes: Where are they from and where are they going? **Plant Disease**, v. 81, n.5, p.430-438, 1997.
- SCHÜEPP, H. Untersuchungen über *Guignardia citricarpa* Kiely, den Erreger der schwarzfleckenkrankheit auf Citrus. **Phytopathol. Z.**, v.40, p. 258-271, 1961,
- SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; J-AUST, H. Endophytes from herbaceous plants and Shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycol.Res.**, v.97, n.12, p.1447-1450, 1993.
- SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, p.67-75, 1984.
- SELA-BUURLAGE, M.B.; EPSTEIN, L.; RODRIGUEZ, R.J. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v.39, p.345-352, 1991.

- SEPULVEDA, N.; RODRIGUEZ, F.; JARA, R. Intoxicacion de bovinos por consumo de festuca (*Festuca arundinacea*) con hongo endofito (*Acremonium coenophialum*). **Archiv. Medicina Veterin.**, v.28, n.1, p.113-116, 1996.
- SHAW, B.D.; KUO, K.; HOCH, H.C. Germination and appressorium development of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores. **Mycologia**, v.99, n.2, p.258-268, 1998.
- SHERWOOD-PIKE, M.; STONE, J.K.; CARROLL, G.C. *Rhabdocline parkeri*, a ubiquitous foliar endophyte of Douglas-fir. **Can. J. Bot.**, v.64, p.1849-1855, 1986.
- SHIGEKAUWA, K.; DOWER, W.J. Electroporation of eucaryotes and procaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. **Biotech.**, v.6, p.742-751, 1988.
- SHIMIZU, S.; ARAI, Y.; MATSUMOTO, T. Electrophoretic karyotype of *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.**, v.60, n.3, p.185-187, 1992.
- SHIMIZU, S.; YOSHIOKA, H.; MATSUMOTO, T. Electrophoretic karyotyping of the entomogenous fungus *Paecilomyces jomosorsus*. **Lett. Appl. Microb.**, v.16, n.4, p.183-186, 1993.
- SIDDIQI, O.H. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. **Genet. Res.**, v.3, p.303-314, 1962.
- SILVA, M.V.; ALVES, P.C.; DUARTE, M.; MOTA, N.; LOBO-DA-CUNHA, A.; HARKNESS, T.A.A.; NARGANG, F.E.; VIDEIRA, A. Disruption of the nuclear gene encoding the 20.8-kDa subunit of NADH:ubiquinone reductase of *Neurospora* mitochondria. **Molec. Gen. Genet.**, v.252, p.177-183, 1996.
- SILVA-FILHO, M.C. **Genética molecular: Técnicas de engenharia genética**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 1995. 64p.
- SILVA-HANLIN, D.M.W.; HANLIN, R.T. Small subunit ribosomal RNA gene phylogeny of several loculoascomycetes and its taxonomic implications. **Mycol. Res.**, v.103, p.153-160, 1999.

- SILVEIRA, W.D.; AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metharirium anisopliae*. **Enz. Microb. Techn.**, v.9, n.3, p.149-152, 1987.
- SINCLAIR, J.B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**, v.75, p.220-224, 1991.
- SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphs**. Germany: J Cramer, 1984. 701p.
- SKATRUD, P.L.; QUEENER, S.W. An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. **Gene**, v.78, p.331-338, 1989.
- SKATRUD, P.L.; QUEENER, S.W.; CARR, L.G.; FISHER, D.L. Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium*. **Curr. Genet.**, v.12, p.337-348, 1987.
- SKINNER, D.Z.; BUDDE, A.D.; FARMAN, M.L.; SMITH, J.R.; LEUNG, H.; LEONG, S.A. Genome organization of *Magnaporthe grisea*: genetic map, electrophoretic karyotype, and occurrence of repeated DNAs. **Theor. Appl. Genet.**, n.87, p.545-557, 1993.
- SKINNER, D.Z.; BUDDE, A. D.; LEONG, S.A. Molecular karyotype analysis of fungi. In: BENNETT, J.W.; LASURE, L.L. (Eds.). **More gene manipulations in fungi**. San Diego: Academic Press, 1991.
- SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1973, 573p.
- SNETSELAAR, K.M.; MIMS, C.W. Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. **Mycol. Res.**, v.98, n.3, p.347-355, 1994.

- SOUZA, A.O. Isolamento e identificação de bactérias endofíticas de milho (*Zea mays* L.) e análise de sua variabilidade genética por RAPD. Piracicaba, 1996. 88p. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SPRINGER, T.L. Allelopathic effects on germination and seedling growth of clovers by endophyte-free and -infected tall fescue. **Crop Science**, v.36, n.6, p.1639-1642, 1997.
- STABEN, C.; JENSEN, B.; SINGER, M.; POLLOCK, J. SCHECHTMAN, M.; KINSEY, J.; SELKER, E. Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. **Fungal Genet. Newsl.**, v.36, p.79-81, 1989.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v.260, p.214-216, 1993.
- STILES, C.M.; OUDEMANS, P.V. Distribution of crawberry fruit-rotting fungi in New Jersey and evidence for nonspecific host resistance. **Phytopathol.**, v.89, n.3, p.218-225, 1999.
- STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells. **Can. J. Bot.**, v.66, p.45-54, 1988.
- SUGHA, S.K.; SINGH, B.M.; SHARMA, B.M. Studies on *Phyllosticta glumarum* causing glume blight of rice (*Oryza sativa* L.). **Himachal Journal of Agric. Res.**, Palampur, v. 12, n.1, p.11-14, 1986.
- SUTHERLAND, I.W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.39, p.243-270, 1985.

- TAKANO, Y.; KUBO, Y.; SHIMIZU, K.; MISE, K.; OKUMO, T. Structural analysis of PKS1, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 249, p.162-167, 1995.
- TALBOT, N.J.; OLIVER, R.P.; CODDINGTON, A. Pulsed field gel electrophoresis reveals chromosome length differences between strains of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulbia fulva*). **Mol. Gen. Genet.**, v.229, p.267-272, 1991.
- TAYLOR, J.L; BORGMANN, I.; SÉGUIN-SWARTZ, G. Electrophoretic karyotyping of *Leptosphaeria maculans* differentiates highly virulent and weakly virulent isolates. **Current Genet.**, v.19, p273-277, 1991.
- TEBEEEST, D.O.; WEIDMANN, G.J. Preparation and regeneration of protoplasts of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschyromene*. **Mycol.**, v.82, p.249-255, 1990.
- TIMBERLAKE, W.E.; MARSHALL, M.A. Genetic engineering of filamentous fungi. **Science**, v.224, p.1313-1317, 1989.
- TIVANG, J.G.; NIENHUIS, J. & SMITH, O.S. Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.259-264, 1994.
- TUDZYNSKI, B.; MENDE, K.; WELTRING, K.M.; KINGHORN, J.R.; UNKLES, S.E. The *Gibberella fujikuroi niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformation and electrophoretic karyotype location. **Microbiol. Read.**, v.142, n.3, p.533-539, 1996.
- TURGEON, B.G.; GARBER, R.C.; YODER, O.C. Transformation of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* using the *Aspergillus nidulans amdS* gene. **Molec. Gen. Genet.**, v.201, p.450-453, 1985.
- TURGEON, B.G.; GARBER, R.; YODER, O.C. Development of a fungal transformation system based on selection of sequences with promoter activity. **Molec. Cell Biol.**, v.7, p.3297-3305, 1987.

- TURNER, G. Vectors for genetic manipulation. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. (Eds). **Aspergillus: 50 years on Progress in Industrial Microbiology**, 1994. cap.24, p.641-664.
- VALENT, B.; CHUMLEY, F.G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.29, p.433-467, 1991.
- VAN ALFEN, N.P. Reassessment of plant wilt toxins. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.27, p.85-88, 1989,
- VAN der AA, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**, n.5, 1973.
- VAN'ETTEN, H.; FUNNELL-BAERG, D.; WASMANN, C.; MCCLUSKEY, K. Location of pathogenicity genes on dispensable chromosomes in *Nectria haematococca* MPVI. **Antonie von Leeuwenhoek**, v.65, p.263-267, 1994.
- VAN'ETTEN, H.; KISTLER, H. *Nectria haematococca*, mating populations I and VI. **Adv. Plant Pathol.**, v.6, p.189-204, 1988.
- VANKAN, J.A.L.; GOVERSE, A.; VANDERVLUGTBERGMANS, C.J.B. Electrophoretic karyotype analysis of *Bothytis cenerea*. **Neth. J. Plant Pathol.**, v.99,(supl.3), p.119-128, 1993.
- VASCONCELOS, M.J.V et al. Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by random amplified polymorphic DNA. **Fitopatol. bras.**, v.19, p.520-523, 1994.
- VIRET, O.; PETRINI, O. Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*). **Mycol. Res.**, v.98, n.4, p.423-432, 1994.
- WAGER, V.A. The black spot disease of citrus in South Africa. **Agr. Sci. Bull.**, v.303, p.52, 1952
- WANG, G.; WHITTAM, T.S.; BERG, C.M.; BERG, D.E. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic Acids Res.**, v.21, p.5930-5933, 1993.

- WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WHITE Jr., J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, v.77, p.323-327, 1985.
- WHITE Jr., J.F.; HUFF, D.R. Endophyte-host associations in grasses. XXIV. Some evidence to support the occurrence of endophyte microspecies complexes centered around sexually-reproducing species of *Epichloe*. **Symbiosis Rehovot**, v.20, n.3, p.219-227, 1996.
- WHITE Jr., J.F.; MORGAN-JONES, G.; MORROW, A.C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of Acremonium endophytes. **Agric. Ecos. Environ.**, v.44, p.13-37, 1993.
- WHITE Jr., J.F.; MORROW, A.C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, v.82, p.218-226, 1990.
- WHITE Jr., J.F.; REDDY, P.V. Examination of structure and molecular phylogenetic relationships of some graminicolous symbionts in genera *Epichloë* and *Parepichloë*. **Mycol.**, v.90, n.2, p.226-234, 1998.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzym.**, v.218, p.704-740, 1993.
- WILSON, J.P.; BURTON, G.W. *Phyllosticta penicillariae* on pearl millet in the United States. **Plant Disease**, v.74, n.4, p.331, 1990.

- WILSON, A.D.; CLEMENTE, S.L.; KAISER, W.J. Survey and detection of endophytic fungi in *Lolium* germplasm by direct staining and aphyd assays. **Plant disease**, v.75, p.169-173, 1991.
- WOLOSHUK, C.P.; SISLER, H.D. Tricyclazole, pyroquilon, tetrachlorophthalide, PCBA, coumarine and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. **J. Pestic. Sci.**, v.7, p.161-166, 1982.
- WRESTLER, J.C.; LIPES, B.D.; BIRREN, B.W.; LAI, E. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Methods in Enzymol.**, v.270, p.255-272, 1996.
- WRIGHT, G.F.K.; GUEST, D.I.; WIMALAJEEWA, D.L.S.; VAN HEESWIJCK, R. Characterisation of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **Europ. J. Plant Pathol.**, v.102, p.451-457, 1996.
- XU, J.R.; YAN, K.Y.; DICKMAN, M.B.; LESLIE, J.F. Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *gibberella-Fujikuroi* (*Fusarium* section liseola). **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.8, p.74-84, 1995.
- YAO, C.; KÖLLER, W. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: different cutinases are expressed during saprophytic and pathogenic stages of *Alternaria brassicicola*. **Molec. Plant-Microbe Interact.**, v.8, p.122-130, 1995.
- YAP, I.V. & NELSON, R.J. Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendograms. IRRI discussion paper n.14, 1996. 22p.
- YOON, C.S.; GLAWE, D.A. Pretreatment with Rnase to improve PCR amplification of DNA using 10-Mer primers. **Biotechn.**, v.14, p.362, 1993.
- ZIMMERMAN, W.C.; BLANCHETTE, R.A.; BURNES, T.A.; FARRELL, R.L. Melanin and perithecial development in *Ophiostoma piliferum*. **Mycologia**, v. 87, p.857-863. 1995.

APÊNDICES

Apêndice 1: Plasmídio pGEM-T Easy Vector da PROMEGA, com 3.018pb. T7: Sítio de início da transcrição da RNA polimerase. SP6: Sítio de início de transcrição da RNA polimerase. *LacZ*: codifica para a extremidade amino terminal da β -galactosidase. *Amp^r*: Gene para resistência a ampicilina. Ori: Origem de replicação autônoma em *Escherichia coli*. Ori f1: Origem de replicação do fago m13 (*f1*).

Apêndice 2: Via de biossíntese da melanina DHN (1,8-dihidroxinaftaleno). THN: trihidroxinaftaleno.

Apêndice 3: Plasmídeo pCSN43, com 5.350 pb. amp: gene para resistência a ampicilina. hygB: gene para resistência a higromicina B (Hygromycin B phosphotransferase). PtrpC e TtrpC: sinais de transcrição do fungo *Aspergillus nidulans*.